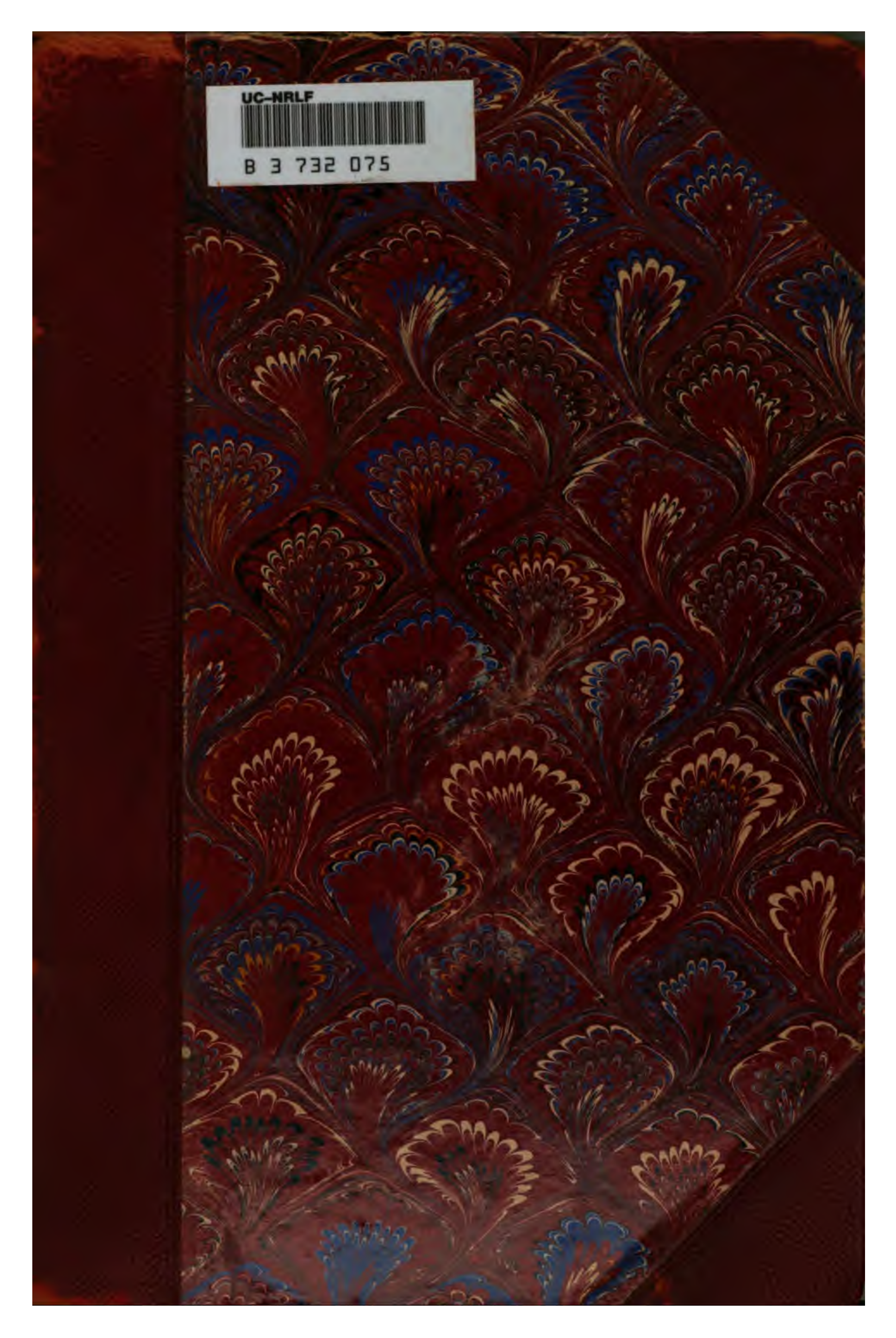
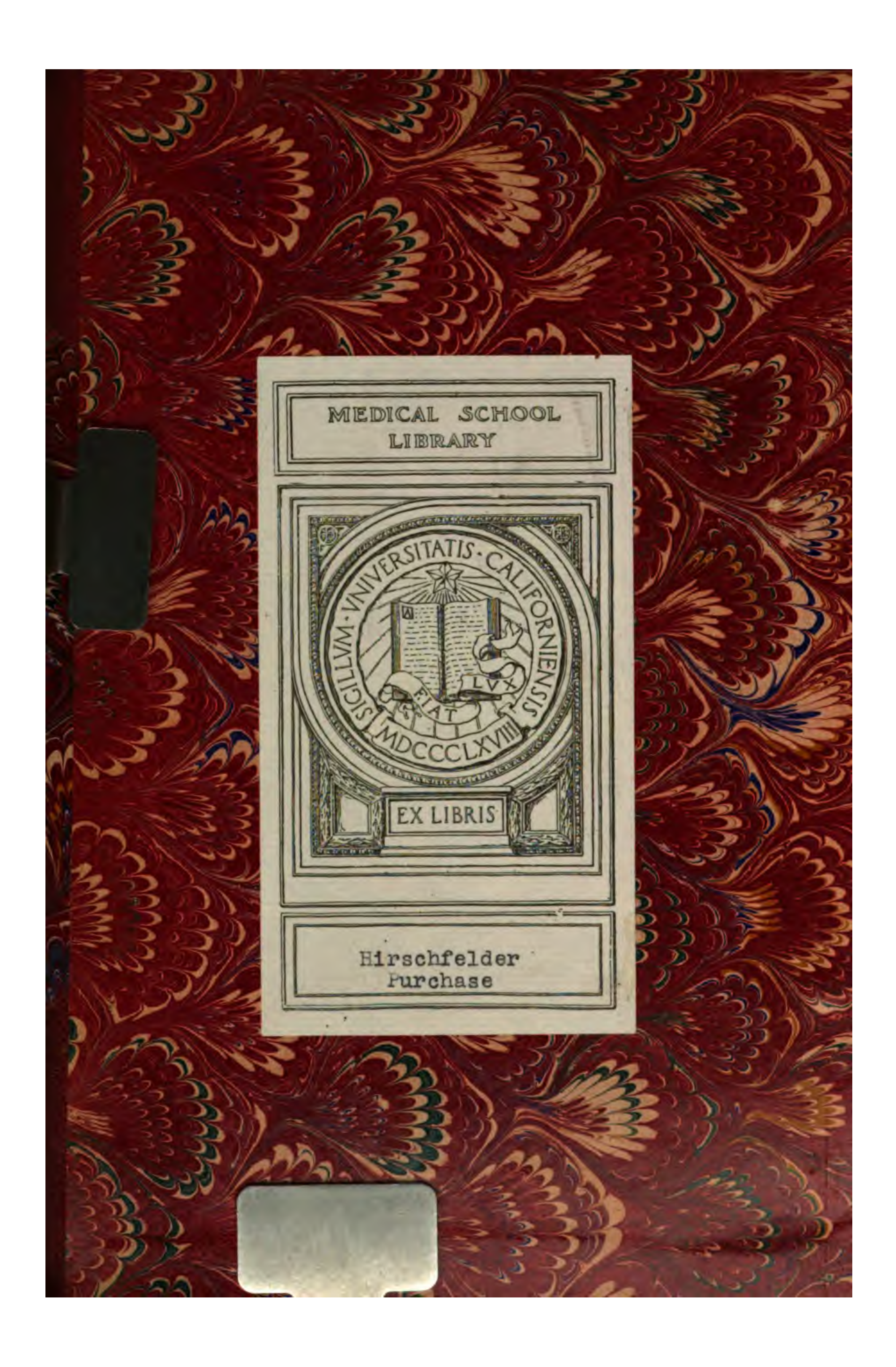
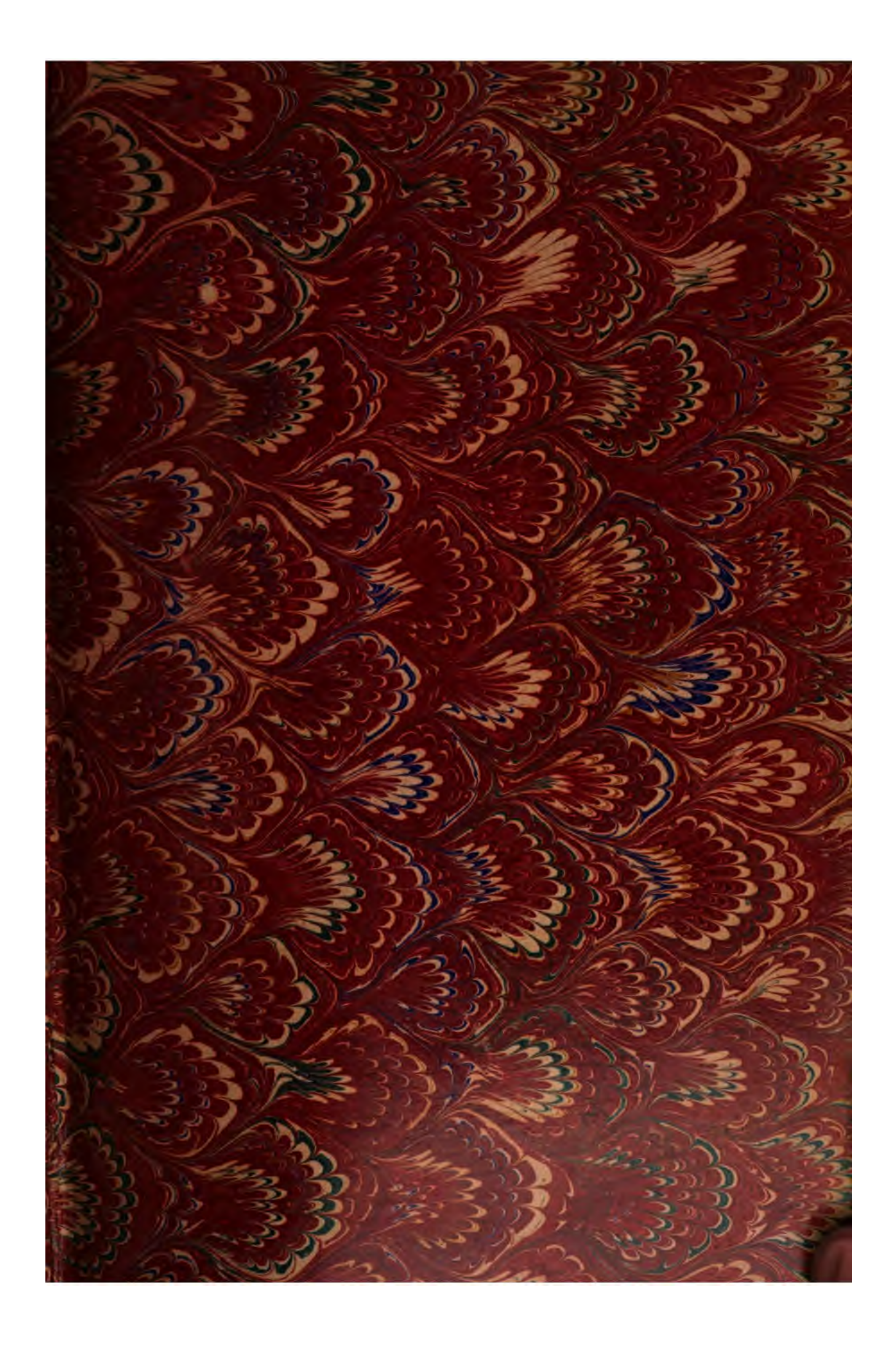



MEDICAL SCHOOL
LIBRARY
SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS
Hirschfelder
Purchase



BEITRÄGE

ZUR

CHEMISCHEN PHYSIOLOGIE

UND

PATHOLOGIE

FÜNFTER BAND

BEITRÄGE

ZUR

CHEMISCHEN PHYSIOLOGIE

UND

PATHOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE GESAMTE BIOCHEMIE

UNTER

MITWIRKUNG VON FACHGENOSSEN HERAUSGEGEBEN

VON

FRANZ HOFMEISTER

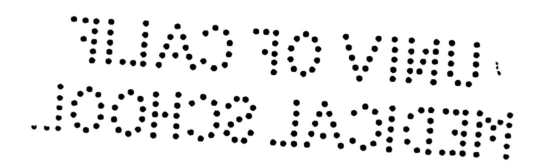
O. PROFESSOR DER PHYSIOLOGISCHEN CHEMIE AN DER UNIVERSITÄT STRASSBURG

FÜNFTER BAND

BRAUNSCHWEIG

VERLAG VON FRIEDRICH VIEWEG UND SOHN

1904



INHALT.

A. Abhandlungen.

I.

Über das Schicksal des Cystins im Tierkörper.

Von Dr. **L. Blum**, Assistent am pathologischen Institut.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Die ersten experimentellen Untersuchungen über das Verhalten des Cystins im Organismus rühren von Baumann*) und seinen Schülern her. Im Anschluß an die Beobachtung eines Falles von Cystinurie suchte sich Baumann Aufklärung über die Ätiologie dieser Stoffwechselerkrankung zu verschaffen. Es schien dies um so aussichtsvoller, als es ihm**) zuvor gelungen war, durch Verfütterung von halogensubstituierten Benzolderivaten, des Chlor-, Brom-, Jodbenzols, an Hunde eine Ausscheidung von gepaarten Cysteinderivaten, den Merkaptursäuren, und so, wie er mit seltenem Scharfblick erkannte, eine „künstliche Cystinurie" hervorzurufen. War hierdurch das schon aus früheren Befunden in Organen (Scherer, Cloetta, Drechsel) wahrscheinlich gewordene Auftreten von Cystin und Cystinabkömmlingen im intermediären Stoffwechsel sichergestellt, so konnte durch Verfolgung der Schwefelausscheidung bei Hunden nach Fütterung von Chlorbenzol festgestellt werden, daß jener Teil des Schwefels, der in den Merkaptursäuren als Cystein der normalen Verbrennung entgeht, unter gewöhnlichen Bedingungen zu Schwefelsäure oxydiert wird***). Der direkte Versuch mit Eingabe von 2,02 g salzsauren Cysteins bei einem kleinen Hunde bestätigte dieses Resultat vollkommen; es zeigte sich, daß vom verfütterten Cystein $^2/_3$ als Schwefelsäure, $^1/_3$ in Form von sogenanntem nicht oxydiertem, neutralem Schwefel ausgeschieden wurde, so daß das normale Verhältnis zwischen nicht oxydiertem und oxydiertem

*) Baumann und Goldmann, Zeitschr. f. physiol. Chemie 12, 254. — Goldmann, das. 9, 260. — Mester, das. 14, 108. — Baumann und Udránszky, das. 15, 87.

**) Baumann und Preuße, Berichte d. deutsch. chem. Ges. 12, 806 und Zeitschr. f. physiol. Chemie 5, 309.

***) Goldmann, Zeitschr. f. physiol. Chemie 9, 260.

Schwefel kaum verändert wurde. Cystin ließ sich nicht im Harne nachweisen, auch keine Rhodanverbindung. Offenbar unterlag das eingeführte Cystin derselben Zersetzung wie der Nahrungsschwefel*).

Auch durch die verschiedensten experimentellen Maßnahmen an einem Kranken mit Cystinurie gelang es nicht, Anhaltspunkte für die Ätiologie zu gewinnen. Erst als mit Hilfe der Benzoylierungsmethode neben Cystin in Harn und Fäces dieses Kranken Diamine gefunden worden waren**), ein Befund, der bald in zwei weiteren Fällen von Cystinurie durch Brieger und Stadthagen***) bestätigt wurde, schien ein Anhaltspunkt für die Erklärung der Cystinurie gegeben. Da die Diamine damals aus tierischem Material nur durch Einwirkung von Bakterien erhalten worden waren, schien die Meinung berechtigt, es handle sich bei der Ausscheidung von Diaminen in Harn und Fäces um einen ähnlichen Prozeß, dessen Sitz im Darm vermutet wurde. Während Baumann†) auch für das Cystin anfangs an diese Entstehung dachte, kam er bald von dieser Auffassung zurück, da schwer einzusehen war, warum das im Darm entstandene Cystin nach seiner Resorption sich anders verhalten sollte als das intermediär gebildete, es sei denn, daß die Anwesenheit der Diamine die Oxydation des Cystins in den Geweben verhinderte. Gegen eine solche Auffassung sprach einmal, daß nicht alle Fälle von Cystinurie mit Ausscheidung von Diaminen einhergehen, sodann ließ sich auch durch Verfütterung von Diaminen an Hunde keine Ausscheidung von Cystin erzielen††).

Durch neuere Untersuchungen über den Abbau der Eiweißkörper ist das Cystin als ein regelmäßiges Spaltungsprodukt schwefelhaltiger Eiweißkörper sowohl bei der Hydrolyse als bei der Pankreasverdauung erkannt worden†††). Als ein Endprodukt der letzteren sind auch die Diamine gefunden worden*†).

Der Gedanke nun, daß wir es bei der Cystinurie mit einer über das Normale hinausgehenden tiefgreifenden Eiweißspaltung

*) Goldmann, Zeitschr. f. physiol. Chemie **9**, 260.

) Baumann und Udránszky, das. **13, 562.

***) Brieger und Stadthagen, Berl. klin. Wochenschr. 1889, S. 345 und Virchows Archiv **115**, 490.

†) Baumann und Udránszky. Zeitschr. f. physiol. Chemie **15**, 77.

††) Das.

†††) Külz, Zeitschr. f. Biol. **17**. — Mörner, Zeitschr. f. physiol. Chemie **28**, 595 und **34**, 20. — Embden, das. **32**, 95.

*†) Werigo, Pflügers Archiv **51**, 362. — Steyrer bei Emerson, Diese Beiträge **1**, 501.

auch Petry*) anwandte, und wie sie ähnlich auch von Mörner**) benutzt wurde. Im Anschluß an Mörner wurde das Schwefelblei mit verdünnter Natronlauge schwefelsäurefrei gewaschen und dann zur Erleichterung der Filtration mit Essigsäure angesäuert. Die Schwefelbestimmungen geschahen nach v. Asbóth-Düring. Der Harn der Tiere wurde durch Katheterisieren gewonnen und konnte so genau abgegrenzt werden.

I. Einführung von Cystin per os.

Ein 9 kg schwerer Hund erhielt am 11. V. 1902 9,6 g Cystin in Gelatinekapseln, darauf Fleisch. In der Nacht Erbrechen, doch läßt sich im Erbrochenen kein Cystin mehr nachweisen. Der Urin am nächsten Morgen zeigt starke Reaktion auf abspaltbaren Schwefel. 100 ccm desselben werden mit 70 ccm 10proz. Natronlauge und 7 ccm Benzoylchlorid geschüttelt, das Filtrat nach Ansäuern wiederholt mit alkoholhaltigem Äther ausgeschüttelt. Es gelang nicht, aus dem Äther, der intensive Reaktion auf bleischwärzenden Schwefel gab, das Natronsalz des Benzoylcystins darzustellen***). Ebensowenig war es durch Versetzen des Harns mit Eisessig und Stehenlassen in der Kälte möglich, Cystin im Sediment nachzuweisen. Da die Benzoylierungsmethode noch den Nachweis von 10 mg Cystin in 100 ccm Harn gestattet†), kann die in den Harn übergegangene Cystinmenge trotz der großen Dosis diesen Wert nicht überschritten haben. Auch der Harn der folgenden Tage ergab kein Cystin.

Tabelle I.

Datum	Harnmenge	Leicht abspaltbarer Schwefel in 50 ccm = Sa	Gesamtschwefel in 50 ccm = S	Gesamtmenge		Verhältnis Sa : S, S = 100	Bemerkungen
				des abspaltbaren Schwefels	des Schwefels		
9	1025	0,00383	0,0615	0,07867	1,261	6,24 %	
10	855	0,00391	0,0648	0,06679	1,108	6,03 %	
11	750	0,01879	0,1422	0,2818	2,133	13,22 %	9,6 gr. Cystin um 10 Uhr mrgs. In der Nacht Erbrechen
12	260	0,00727	0,0422	0,03776	0,2092	18,05 %	Sehr krank und matt Abends tot

Wie die Schwefelzahlen der Tabelle I zeigen, folgt auf die Cystindarreichung eine nicht unerhebliche Vermehrung des abspaltbaren Schwefels, so daß der Prozentgehalt von 6,03 auf 13,22 Proz. (Gesamtschwefel = 100) und am Tage darauf auf

*) Petry, das. 30, 45.

**) Mörner, das. 34, 211.

***) Goldmann und Baumann, a. a. O. — Mester, a. a. O. — Brenzinger, Zeitschr. f. physiol. Chemie 16, 572.

†) Goldmann und Baumann, a. a. O. S. 256.

18,05 Proz. ansteigt. Da nach den vergeblichen Versuchen, Cystin im Harne nachzuweisen, die Vermehrung nicht durch Anwesenheit erheblicher Mengen von Cystin bedingt sein konnte, so war daran zu denken, daß sie vielleicht auf Vermehrung der unterschwefligen Säure beruhe. Es war leicht nachzuweisen, daß der Harn nach den Versuchstagen große Mengen an solcher enthielt. Starkes Ansäuern des Harns genügte, um eine Fällung von Schwefel durch Zersetzung der unterschwefligen Säure zu veranlassen; nach Filtration und Lösen des Filterrückstandes in Chloroform oder heißem Benzol kristallisierte derselbe in typischer Kristallform. Es gelang ebenso leicht, das Barytsalz der Thioschwefelsäure nach Schmiedeberg*) zu erhalten, was nur bei Anwesenheit größerer Mengen an solcher gelingt.

Das Tier bekam nach Eingabe des Cystins eine sehr starke hämorrhagische Nephritis, der Harn vom 12. war stark eiweißhaltig. Die Sektion ergab hämorrhagische Nephritis und hämorrhagische Entzündung des Dünndarms.

Zur Ausführung der Schwefelbestimmung wurde der Harn nach dem Aufkochen mit Salpetersäure angesäuert, vom Eiweißniederschlag abfiltriert und letzterer mit ganz verdünnter Salpetersäure ausgewaschen.

Ein 2. Versuch, in dem ein 9600 g schwerer Hund etwa 4,5 g Cystin erhielt, zeigt, wie aus Tabelle II hervorgeht, insofern ein abweichendes Verhalten, als hier überhaupt keine Vermehrung des abspaltbaren Schwefels im Verhältnis zum Gesamtschwefel eintrat. Während sich eine absolute Vermehrung entsprechend der Menge des eingeführten Cystins zeigte, blieb das Verhältnis Sa:S am ersten Tage nach der Fütterung unter dem Werte des vorhergehenden Tages und erreichte diesen kaum am folgenden Tage.

Tabelle II.

Datum	Harnmenge	Abspaltbarer Schwefel in 50 ccm = Sa	Gesamtschwefel in 50 ccm = S	Gesamtmenge		Verhältnis Sa : S, S = 100	Bemerkungen
				des abspaltbaren Schwefels	des Schwefels		
26	480	0,00213	0,03582	0,02046	0,3438	5,95%	
27	415	0,00294	0,0511	0,02443	0,4241	5,76%	
28	480	0,00450	0,1229	0,04317	1,181	3,67%	4,5 g Cystin um 10 Uhr morgens
29	335	0,00325	0,06274	0,02175	0,4243	5,179%	Urin eiweißfrei, Hund etwas matt, sonst normal.

*) Schmiedeberg, Archiv für Heilkunde 8, 422. — Salkowski, Virchows Archiv 58, 465.

Der Unterschied ist vielleicht durch die viel kleinere, nur die Hälfte betragende Cystinmenge bedingt, vielleicht auch dadurch, daß die Bildung der unterschwefligen Säure sehr starken individuellen Schwankungen unterliegt, indem bei manchen Tieren ein Teil des eingeführten Schwefels als Thioschwefelsäure den Körper verläßt, der bei anderen zu Schwefelsäure oxydiert wird. Auch in diesem Falle ließ sich kein Cystin im Harne nachweisen, wie es ja die gefundenen Zahlen erwarten ließen.

Den Resultaten nach reihen sich an diese Versuche zwei an, bei denen Cystin Hunden, die mit Phosphor vergiftet waren, gegeben wurde; der eine erkrankte nur leicht, der zweite (in Tabelle IV) schwerer; doch endete die Vergiftung nach Aussetzen der Phosphorgaben auch bei dem zweiten nicht tödlich. Die Angabe Goldmanns und Baumanns*), daß nach Phosphorvergiftung eine erhebliche Vermehrung der durch Benzoylierung nachweisbaren cystinähnlichen Substanz des Harns auftrete, konnte seinerzeit durch Petry**) insofern nicht bestätigt werden, als er keine erhebliche Änderung im Verhältnis von Gesamtschwefel zu abspaltbarem Schwefel fand. Auch die folgenden Versuche zeigen, daß bei Phosphorhunden eine Störung in der Verarbeitung des Cystins nicht vorhanden ist; doch sind die absoluten Tagesmengen für den abspaltbaren Schwefel erheblich höher wie vorher.

Tabelle III.

	Harnmenge	Abspaltbarer Schwefel in 50 ccm = Sa	Gesamtschwefel in 50 ccm = S	Gesamtmenge		Verhältnis Sa : S, S = 100	Bemerkungen
				des abspaltbaren Schwefels	des Schwefels		
8 Tage vor der Cystindarreichung	350	0,00946	0,06423	0,06624	0,4502	14,71 %	erhält tags darauf 0,01 Phosphor subkutan, 3 Tage darauf die gleiche Dosis
Tag vor der Cystinfütterung	465	0,00817	0,10465	0,09735	0,7598	12,81 %	leicht ikterisch, frißt nicht
	560	0,00913	0,1225	0,12514	1,3720	7,46 %	2,7 g Cystin
Tag nach der Cystinfütterung	450	0,01011	0,0935	0,09097	0,8415	10,81 %	

*) Goldmann und Baumann, Zeitschr. f. physiol. Chemie 12, 254.
**) Petry, a. a. O. S. 58.

Tabelle IV.

Datum	Harn-menge	Abspalt-barer Schwefel in 50 ccm = Sa	Gesamt-schwefel in 50 ccm = S	Gesamtmenge des abspalt-baren Schwefels	Gesamtmenge des Schwefels	Verhältnis Sa : S, S = 100	Bemerkungen
19	450	0,00667	0,09016	0,0604	0,8115	7,40 %	am 13. 0,01 g Phosphor subkutan, desgleichen am 16.; frißt nichts, seit 17. stark ikterisch. Urin leicht eiweißhaltig
20	230	0,00551	0,08742	0,02537	0,4021	6,31 %	8,9 g Cystin, davon 0,8 g 6 Stunden nach Eingabe erbrochen
21	550	0,0077	0,08968	0,08473	0,9865	8,58 %	

Wie aus den Zahlen der Tabellen hervorgeht, ist der Organismus des Hundes imstande, sehr große Mengen von Cystin bei deren Einführung in den Magen zu bewältigen. Da nun das Cystin vielleicht infolge seiner Schwerlöslichkeit nur langsam resorbiert wird (die Gesamtschwefelzahlen an den Tagen, wo Cystin verabreicht wurde, sprechen allerdings nicht dafür), so wurde geprüft, wie sich im Organismus das Schicksal des leicht löslichen und vielleicht besser resorbierbaren Cysteins gestaltet. In dem zu Beginn erwähnten Versuche von Goldmann wurde ebenfalls Cystein als salzsaures Salz verfüttert, jedoch nur eine einmalige kleine Menge, 2,02 g. Ich habe bei Anwendung viel größerer Dosen das gleiche negative Resultat erhalten.

Ein etwa 6 kg schwerer Hund erhielt im Verlauf von 5 Tagen täglich 9 g salzsaures Cystein, im ganzen 45 g; die täglich zu verabreichende Menge wurde in 15 bis 20 ccm Wasser gelöst, die Lösung mit Ammoniak kurz vor der Eingabe schwach sauer gemacht und dem Tiere mit der Schlundsonde beigebracht. Es konnte danach nie Cystin im Harn nachgewiesen werden, nur die Menge der Thioschwefelsäure war sehr stark vermehrt.

In weiteren Versuchen wurde das Verhalten des Cystins nach seiner Einführung in den Magen des Pflanzenfressers untersucht. Die Unterschiede im Stoffwechsel, die zwischen Pflanzen- und Fleischfressern bestehen, treten gerade im Schwefelstoffwechsel scharf hervor, so in der Ausscheidung von Thioschwefelsäure und Äthylsulfid bei Hunden und Katzen, während sie im Harn der Pflanzenfresser fehlen. Weiterhin haben die Versuche von Salkowski*) über das Schicksal des Taurins im Tierkörper einen

*) Salkowski, Virchows Archiv 58, 460.

Unterschied in dessen Verhalten bei Fleisch- und Pflanzenfressern ergeben; während bei Kaninchen das Taurin in den Magen eingeführt als Schwefelsäure und unterschweflige Säure ausgeschieden wird, nach subkutaner Injektion als Taurin, wird es beim Hunde nach Einfuhr in den Magen als Taurocarbaminsäure ausgeschieden, ohne die unterschweflige Säure zu vermehren.

Ein Kaninchen von 3400 g erhält 1,5 g Cystin in Soda gelöst mit der Schlundsonde; der mit dem Katheter gewonnene Urin zeigt überhaupt keine Reaktion auf abspaltbaren Schwefel, auch nicht am folgenden Tage.

Ein zweites Kaninchen von 2800 g erhielt an drei aufeinander folgenden Tagen je 2 g Cystin in Soda gelöst mit der Schlundsonde; auch in diesem Falle konnten im Harn nur Spuren bleischwärzenden Schwefels nachgewiesen werden; dagegen zeigte sich der Harn in beiden Fällen überaus reich an Sulfaten, so daß nach Versetzen des Harns mit Essigsäure und Stehenlassen in der Kälte Gips in großer Menge auskristallisierte, ein Verhalten, das normaler Kaninchenharn nicht zeigt.

Es findet also beim Kaninchen, ähnlich wie Goldmann*) beim Hunde fand, eine Oxydation des Cystins zu Schwefelsäure (vielleicht auf dem Umwege über Taurin) statt.

II. Versuche mit subkutaner Einführung.

Ein Hund von 9 kg erhält subkutan 1,1 g Cystin in 90 ccm ³/₄ proz. Natriumkarbonatlösung gelöst unter die Bauchhaut. Ein anderer Hund von 11 kg erhält 2,2 g Cystin unter den gleichen Bedingungen.

Ein Auftreten von Cystin konnte im Harn nicht beobachtet werden und auch die Schwefelbestimmungen im Harn lassen von einer Vermehrung des abspaltbaren Schwefels, die dafür spräche, nichts erkennen.

Tabelle V.

Datum	Harnmenge	Leicht abspaltbarer Schwefel in 50 ccm = Sa	Gesamtschwefel in 50 ccm = S	Gesamtmenge		Verhältnis Sa : S, S = 100	Bemerkungen
				des abspaltbaren Schwefels	des Schwefels		
15	355	0,01099	0,10965	0,07803	0,7783	10,02%	
16	290	0,01185	0,1546	0,06876	0,8759	7,85%	1,1 g Cystin subkutan
17	275	0,01271	0,1446	0,06990	0,8065	8,67%	Urin eiweißfrei
18	375	0,00979	0,1447	0,07345	1,0850	6,77%	Urin eiweißfrei

*) Goldmann, a. a. O.

Die Resultate der Einführung des Cystins unter die Haut und in den Magen stimmen mit den Ergebnissen überein, die Abderhalden und Bergell*) bei diesen Einverleibungsarten mit anderen Aminosäuren, dem Glykokoll, Alanin, Leucin und Phenylalanin erhielten. Auch hier konnten nach Verfütterung im Harne Aminosäuren überhaupt nicht, nach subkutaner Darreichung nur in Spuren nachgewiesen werden.

III. Versuche mit intravenöser Injektion.

a) In periphere Körpervenen.

Einem etwa 9 kg schweren Hunde wird 1,4 g Cystin, in 50 ccm 3 proz. Natriumkarbonatlösung gelöst, in die Vena jugularis injiziert; die Dauer der Injektion beträgt 20 Minuten. Das Tier erträgt den Eingriff ganz gut; 2½ Stunden nach der Injektion werden durch Katheterisieren 290 ccm eines alkalischen, ganz klaren Urins entleert, der sehr starke Reaktion auf abspaltbaren Schwefel gibt. Schon nach Ansäuern mit Essigsäure fällt Cystin in typischer Kristallform aus und beim Stehen in der Kälte vermehrt sich dieser Niederschlag. Dagegen findet sich in diesem Harn nur äußerst wenig unterschweflige Säure, wie die Destillation desselben nach Ansäuern bei dem Verfahren von Salkowski**) ergibt.

Tabelle VI.

Datum	Harnmenge	Abspaltbarer Schwefel in 50 ccm = Sa	Gesamtschwefel in 50 ccm = S	Gesamtmenge des abspaltbaren Schwefels	Gesamtmenge des Schwefels	Verhältnis Sa : S, S = 100	Bemerkungen
Tag vor der Injektion	300	0,00930	0,15895	0,05579	0,9536	5,85%	
2½ Std. nach der Injektion	290	0,02244	0,06547	0,1301	0,3798	34,26%	Injektion von 1,4 g Cystin
24 Std. nach der Injektion	355	0,00965	0,10905	0,06851	0,7749	8,84%	

Die Zahlen der Tabelle VI ergeben für das Verhältnis von abspaltbarem Schwefel zum Gesamtschwefel (Sa:S), 34,26 Proz. gegen 5,85 Proz. am Tage vor der Injektion. Bedenkt man, daß nach F. N. Schulz***) das Cystin nur die Hälfte, nach Mörner†) etwa

*) Abderhalden und Bergell, Zeitschr. f. physiol. Chemie 39, 10.
**) Salkowski, a. a. O. und Pflügers Archiv 39, 213.
***) F. N. Schulz, a. a. O.
†) Mörner, a. a. O.

$^{1}/_{2}$ seines Schwefels nach dieser Methode abspalten läßt, so läßt sich berechnen, daß nach $2^{1}/_{2}$ Stunden immerhin 50 Proz. des eingeführten Cystins zur Ausscheidung gelangt ist.

Der Harn der folgenden 24 Stunden zeigt in der Tat nur noch geringe Vermehrung des abspaltbaren Schwefels; es waren darin mittels Benzoylierung nur noch Spuren Cystin nachzuweisen.

In bezug auf die Fähigkeit des Organismus, das so einverleibte Cystin zu verarbeiten, besteht ein Unterschied gegenüber anderen Aminosäuren; so konnte Cohn*) nach Injektion von salzsaurem Tyrosinäthylester im Harn weder diesen selbst, noch ähnliche Substanzen, die die Millonsche Reaktion geben, nachweisen.

Daß aber auch bei dieser Art der Einführung dem Organismus die Fähigkeit zukommt, Cystin zu zerstören, geht aus folgendem hervor: Erfolgt die Injektion statt mit der angegebenen Geschwindigkeit von 1 bis 2 ccm in der Minute langsamer, so daß die Zeit der Injektion für dieselbe Menge etwa das vier- bis fünffache beträgt, so läßt sich im Urin beinahe kein Cystin nachweisen, und dementsprechend fallen auch die Zahlen (Tabelle VII) für das Verhältnis zwischen abspaltbarem Schwefel und Gesamtschwefel nur um das Doppelte höher aus, als in der Norm, 11,60 Proz. gegen 5,97 Proz.

Ein Hund von 13 kg erhält 1,5 g Cystin gelöst in 70 ccm einer $2^{1}/_{2}$ proz. Natriumkarbonatlösung in eine Cruralvene injiziert. Die Dauer der Injektion beträgt $1^{1}/_{2}$ Stunden. Im Harn treten nach der Injektion geringe Mengen von Eiweiß auf.

Tabelle VII.

Datum	Harnmenge	Abspaltbarer Schwefel in 50 ccm = Sa	Gesamtschwefel in 50 ccm = S	Gesamtmenge des abspaltbaren Schwefels	Gesamtmenge des Schwefels	Verhältnis Sa : S, S = 100	Bemerkungen
Tag vor der Injektion	?	0,01146	0,1699	?	?	5,97%	
Harn 4 Stdn. nach der Injektion	140	0,01160	0,1736	0,05638	0,4861	11,60%	Injektion von 1,5 g Cystin
24 Std. nach der Injektion	230	0,00905	0,08714	0,03625	0,4008	8,84%	

*) R. Cohn, Zeitschr. f. physiol. Chemie 14, 189.

Möglicherweise spielte in diesem Falle auch eine besondere Fähigkeit des betreffenden Tieres, Cystin zu zerstören, eine Rolle, wie ja individuelle Schwankungen im Schwefelstoffwechsel geradezu die Regel sind.

In weiteren Versuchen wurde einem etwa 9 kg schweren Hunde 1,6 g in 50 ccm einer 3 proz. Natriumkarbonatlösung gelöstes Cystin in die Cruralvene und einem anderen Hunde von 10 kg 1,5 g in der gleichen Weise gelöstes Cystin in die Jugularvene injiziert; die Injektionsdauer betrug 15 Minuten. In dem 3 bis 4 Stunden nach der Injektion entleerten Urin zeigten sich trotz dessen stark alkalischer Reaktion Cystinkristalle, deren Menge durch Ansäuern mit Essigsäure noch erheblich zunahm.

Bei dieser Art der Injektion gelangt das Cystin zu einem erheblichen Teil in die Nieren, ohne ein größeres drüsiges Organ, namentlich die Leber passiert zu haben. Es war zu untersuchen, ob sich bei Injektion in eine Mesenterialvene dieselben Verhältnisse ergeben, wenn es seinen Weg durch den Pfortaderkreislauf nimmt, wie bei seiner Resorption vom Darmkanal aus.

b) Injektion in eine Mesenterialvene.

Einem Hunde von etwa 30 kg wird in eine mittelgroße Mesenterialvene 1,4 g Cystin, das in 40 ccm 3 proz. Natriumkarbonatlösung gelöst ist, injiziert; die Dauer der Injektion beträgt 15 Minuten. Das Tier erträgt den Eingriff sehr gut. $6^1/_2$ Stunden nach der Injektion wird durch Katheterisieren stark alkalischer, eiweißfreier Urin entleert. Weder durch Benzoylieren noch durch Ansäuern mit Eisessig und Stehenlassen in der Kälte gelingt es aus dem Harn Cystin darzustellen; ebensowenig aus dem Harn der folgenden 24 Stunden. Die Schwefelbestimmungen ergeben in der Tat nur eine geringe Vermehrung des abspaltbaren Schwefels (Tabelle VIII).

Tabelle VIII.

Datum	Harnmenge	Abspaltbarer Schwefel in 50 ccm = Sa	Gesamtschwefel in 50 ccm = S	Gesamtmenge des abspaltbaren Schwefels	Gesamtmenge des Schwefels	Verhältnis Sa : S, S = 100	Bemerkungen
Tag vor der Injektion	530	0,008789	0,1207	0,09317	1,280	7,282 %	
$6^1/_2$ Std. nach der Injektion	335	0,01153	0,09842	0,07722	0,6594	11,71 %	Injektion von 1,4 g Cystin
24 Std. nach der Injektion	410	0,006478	0,09514	0,05312	0,7793	6,816 %	Urin eiweißfrei

Die Wiederholung des Versuches bei einem etwa 31 kg schweren Hunde ergab dasselbe Resultat. Nach Injektion von 1,4 g Cystin, in 50 ccm 3proz. Sodalösung gelöst, im Laufe von 25 Minuten läßt sich im Urin kein Cystin nachweisen, und dem entsprechen auch die Zahlen der Tabelle IX.

Tabelle IX.

Datum	Harnmenge	Abspaltbarer Schwefel in 50 ccm = Sa	Gesamtschwefel in 50 ccm = S	Gesamtmenge des abspaltbaren Schwefels	Gesamtmenge des Schwefels	Verhältnis Sa : S, S = 100	Bemerkungen
Tag vor der Injektion	900	0,00505	0,06418	0,09086	1,107	8,21 %	
7 Std. nach der Injektion	300	0,00582	0,07455	0,03491	0,4493	7,78 %	Injektion von 1,4 g Cystin
24 Std. nach der Injektion	600	0,00428	0,09147	0,05134	1,098	4,68 %	Urin eiweißfrei

Die Verschiedenheit im Verhalten des Cystins, je nachdem die Injektion in eine periphere Vene oder in eine Darmvene erfolgt, kann von zwei Umständen herrühren: einmal ist es möglich, daß die Verlangsamung des Blutkreislaufs bei der Auflösung des Pfortaderkreislaufs in den Leberkreislauf ähnliche Verhältnisse bedingt, wie sie im Versuche der Tabelle VI wiedergegeben sind, wo nach sehr langsamer Injektion auch in eine periphere Vene nur Spuren von Cystin im Harn auftraten. Andererseits kann aber auch daran gedacht werden, daß bei der nahen chemischen Beziehung zwischen Cystin und Taurin und der Rolle der Leber bei der Taurinbereitung, es sich bei diesem Durchgang durch die Leber um eine Fähigkeit der letzteren handelt, zugeführtes Cystin zurückzuhalten und zu verarbeiten. Es gelingt zwar auch bei Injektion in eine Mesenterialvene Cystin im Harne zu erhalten, nämlich wenn die Injektion unter sehr starkem Druck und direkt in einen Seitenast der Pfortader erfolgt*), und es mag somit der Unterschied in der Stromgeschwindigkeit einen merklichen Einfluß auf die Zerstörung des intravenös beigebrachten Cystins im Organismus haben. Doch genügt die Ausschaltung

*) So ließen sich in einem Versuche, wo 2,0 g Cystin in 60 ccm 4proz. Natriumkarbonatlösung direkt in die Vene mesenterica injiziert wurden, und die Injektionszeit 7½ Minuten betrug, im Urin Kristalle von Cystin nachweisen; doch war ihre Menge gering und auch nach Benzoylierung die Ausbeute nur spärlich.

dieses Faktors nicht, um nach Injektion in eine Mesenterialvene eine Ausscheidung von Cystin wie nach Injektion in eine periphere Vene zu erhalten. Die Möglichkeit eines spezifischen Einflusses der Leber auf das Cystin bleibt daher wohl bestehen.

IV. Versuche mit Leberbrei.

Um über diesen Einfluß der Leber eine Vorstellung zu gewinnen, wurden mehrfach Versuche angestellt.

400 g frischer Rindsleber werden fein zerhackt und mit 50 ccm defibrinierten Blutes und 2,8 g Cystin gemischt; das Ganze wird unter fortgesetztem Rühren im Brutschrank bei 37° sieben Stunden stehen gelassen. Eine ebenso große Lebermenge wird mit dem gleichen Volumen Blut versetzt und ebenso behandelt. Beide Portionen werden auf Taurin verarbeitet. Der Leberbrei wird mit großen Mengen siedenden Wassers, das saures Natriumphosphat enthält, ausgezogen, koliert, die Extraktionsflüssigkeit eingeengt und mit Bleiessig versetzt; das Filtrat entbleit, auf ein kleines Volumen eingedampft, mit viel Alkohol versetzt und in die Kälte gestellt. Es konnte kein Taurin nachgewiesen werden.

Leberbrei vermag demnach für sich nicht merkliche Mengen Cystin in Taurin überzuführen. Zu dem gleichen negativen Ergebnisse führte ein Versuch, bei dem ein Hund 5,6 g Cystin in eine Mesenterialvene injiziert erhielt und 2 Stunden darauf durch Verblutenlassen getötet wurde. Die Leber in derselben Weise verarbeitet enthielt kein Taurin. (Normale Hundeleber enthält kein Taurin.) Bemerkenswert war aber das Verhalten der Galle. Die Untersuchung derselben ergab die Reaktion auf abspaltbaren Schwefel, während normale Galle und auch solche von Gallenfistelhunden, die Cystin per os erhalten hatten, diese Reaktion nicht aufweist. Bei der geringen zur Verfügung stehenden Menge Galle konnte an eine Darstellung des diese Reaktion bedingenden Körpers nicht gedacht werden; derselbe erwies sich aber als in Alkohol und Essigsäure löslich, war also sicher kein unverändertes Cystin. Durch Fällen mit ammoniakalischem Blei wurde mit der Taurocholsäure ein Teil dieses Schwefelkörpers gefällt. Nach Entbleien des Niederschlags und Einengen des Filtrats zum Sirup, Aufnahme in absolutem Alkohol, Fällen mit Äther und nochmaligem Fällen mit Bleiazetat zeigte das Filtrat immer noch neben der sehr starken Pettenkoferschen Reaktion die Bleiprobe, so daß an eine Verbindung des Cystins, bzw. eines Cystinabkömmlings mit Cholsäure gedacht werden mußte.

Es könnte sich z. B. die Umwandlung des Cystins zu Taurin im Organismus in der Art vollziehen, daß die Cholsäure sich zuerst in der Leber mit Cystin verbindet und die so entstandene Verbindung zu Taurocholsäure oxydiert wird. Eine Prüfung dieser Vermutung durch Tierexperiment und Reindarstellung der Substanz war bei den geringen

zu erwartenden Ausbeuten von vorne herein aussichtslos. Daß aber solche Verbindungen von Cholsäure mit Cystin bzw. seinen Abkömmlingen existenzfähig sind, ließ sich durch den Versuch zeigen. Durch vorsichtiges Schmelzen äquivalenter Mengen Cholsäure und Cystin erhielt ich in der Tat saure, in Eisessig und absolutem Alkohol lösliche Produkte, die starke Schwefelbleireaktion gaben.

Es ergibt sich aus den vorliegenden Versuchen, daß die Zerstörbarkeit des Cystins bei intravenöser Einführung zwar eine geringe ist, daß aber unter normalen Verhältnissen der Organismus die Verarbeitung des Cystins, wie ja auch andere in der Norm an ihn herantretenden Aufgaben innerhalb weit über den Durchschnittsbedarf hinausgehender Grenzen zu bewältigen vermag. Auch eine Überschwemmung des Darms mit Cystin bis zur toxischen Grenze führt nicht zur Cystinurie. Hiernach ist die Vorstellung, daß die Cystinurie auf einer abnormen, weitgehenden Eiweißspaltung beruht, fallen zu lassen.

Das Blut und die Nieren scheinen bei der Zersetzung des Cystins keine Rolle zu spielen. Daß dagegen die Leber dabei eine besondere Bedeutung hat, war von vornherein zu vermuten, und ist durch die Untersuchungen von v. Bergmann*) jetzt direkt erwiesen. Auch die von mir beobachtete Verschiedenheit in der Cystinausscheidung nach Einführung in eine periphere und eine Mesenterialvene spricht für eine solche Auffassung, wenngleich der sich in der Leber abspielende, vermutlich nicht ganz einfache Vorgang noch näherer Aufklärung bedarf.

Über die aus dem Cystin entstehenden organischen Schwefelverbindungen gedenke ich später zu berichten.

*) a. a. O.

II.

Über das Schicksal der Monaminosäuren im Tierkörper nach Einführung in die Blutbahn.

Von **Karl Stolte.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Die Tatsache, daß der mit dem Eiweiß der Nahrung eingeführte Stickstoff zum weitaus größten Teil in Form von Harnstoff zur Ausscheidung kommt, führt von vornherein zu dem Schlusse, daß auch die im Eiweißmolekül enthaltenen Aminosäuren zur Bildung von Harnstoff dienen. In der Tat gilt dies seit Nenckis und Schultzens*) wichtiger Arbeit für ausgemacht. Nencki und Schultzen verfütterten Leucin und Glykokoll, Salkowski**) wiederholte die Versuche und dehnte sie auf Sarkosin und Alanin aus, und Knieriem***) machte dieselben Experimente mit Asparaginsäure. Stets erfuhr durch die eingeführten Aminosäuren jener Teil des Harnstickstoffes eine entsprechende Vermehrung, der auf Grund der angewandten Methoden ganz oder doch bei weitem überwiegend auf Harnstoff bezogen werden muß. Diese Methoden lassen immerhin die Möglichkeit offen, daß ein, wenn auch sicher nur kleiner Bruchteil der verfütterten Aminosäuren unverändert durch den Körper hindurchgeht. Es fehlte an Hilfsmitteln, kleine Mengen von Aminosäuren im Harn aufzufinden. Daß in der Tat die Fähigkeit des Organismus, eingeführte Aminosäuren zu zersetzen, eine Grenze hat, lehrten aber schon die Beobachtungen Salkowskis, der beim Hunde nach Darreichung von 25 g Glykokoll einen Teil unverbrannt den Körper verlassen, und Erfahrungen Blendermanns†), der nach Verfütterung von Tyrosin an Kaninchen Tyrosinhydantoin auftreten sah. Daß nach Einfuhr mäßiger Dosen keine merklichen Mengen von unveränderten Aminosäuren ausgeschieden werden,

*) Zeitschr. f. Biologie 8, 124.
**) Zeitschr. f. physiol. Chemie 4, 100ff.
***) Zeitschr. f. Biologie 10, 263.
†) Zeitschr. f. physiol. Chemie 6, 234.

ist in jüngster Zeit von Abderhalden und Bergell*) gezeigt worden. Mit Hilfe von Naphthalinsulfochlorid konnten sie nach wiederholter Einnahme von Glykokoll (bis 5 g) von i-Alanin (3 g), Leucin (8 g), Phenylalanin (3 g), diese Aminosäuren nicht im Harn auffinden. Abderhalden und Bergell haben überdies gezeigt, daß beim Kaninchen selbst nach subkutaner Injektion von 3 und 2 g Glykokoll nur Spuren davon im Harne erscheinen.

Auf Herrn Prof. Hofmeisters Veranlassung untersuchte ich das Schicksal der wichtigsten Monaminosäuren nach Einbringung in das Blut darauf, ob sie eine Vermehrung des Harnstoff- oder des Monaminosäuren-Stickstoffs im Urin veranlassen, und suchte zugleich eine Vorstellung darüber zu gewinnen, ob sie vom Organismus gleich gut angegriffen werden.

I.

Versuchsanordnung.

Die sämtlichen Injektionsversuche wurden an demselben Kaninchen angestellt. Es wog beim Beginne der Arbeit etwa 3000 g. Um möglichst viel Harn zu gewinnen, habe ich es zuerst mit Rüben und Brot, später (vom 7. Juli ab) nur mit Rüben gefüttert. Der Harn wurde mit dem Katheter entnommen.

Da der Harn fast nie von selbst ausfloß, war es nötig, ihn durch leichte Aspiration zu entleeren. Zu diesem Zwecke wurde der Katheter mit einer Flasche mit doppelt durchbohrtem Stöpsel verbunden, in welche bei Luftverdünnung der Harn einfloß.

Das Katheterisieren wurde an den Versuchstagen in Pausen von einigen Stunden vorgenommen. In der Zwischenzeit saß das Tier in einem Käfig, der so eingerichtet war, daß aller Harn in einem untergestellten Gefäße aufgesammelt wurde. Der so erhaltene Urin wurde mit dem beim nächsten Katheterisieren gewonnenen vereinigt.

Es sei ausdrücklich hervorgehoben, daß das Tier diesen Eingriff sehr gut vertrug und trotz etwa 60 mal wiederholten Katheterisierens keine Zeichen von Cystitis darbot.

Die anfangs benutzte Methode, das Tier aufzubinden, zu narkotisieren und ihm dann eine Blasenkanüle einzubinden, mußte ich fallen lassen, weil meine ersten derart ausgeführten Versuche zu große Störungen in der Stickstoffverteilung des Harnes ergaben. Es wich nämlich schon im Normalharn der aufgebundenen, mit Chloralhydrat narkotisierten und dann operierten Tiere (also in den vor der Injektion gesammelten Proben) das Verhältnis des auf Harnstoff zu beziehenden Stickstoffs zum gesamten nichtbasischen Stickstoff in hohem Grade von den sonst bekannten Prozentzahlen ab. Normalerweise beträgt der Harnstoff-Stickstoff des Phosphorwolframsäurefiltrates (s. w. unten) etwa 83 bis 88 Proz. des ge-

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie **39**, 9.

samten darin enthaltenen Stickstoffs. Bei chloralisierten und aufgebundenen Tieren fand ich aber meist eine auffallend niedrige Zahl, z. B.:

Versuch 1: 53,8 Proz.,
„ 2: 61,3 „
„ 3: 43,3 „
„ 4: 52,5 „

Ich war bemüht, die Ursache dieser Abweichung zu ermitteln und konnte nachweisen, daß sowohl die Narkose wie das Aufbinden der Tiere darauf nicht ohne Einfluß waren. Eine Quelle der Täuschung könnte auch die Ausscheidung von Zucker und Glykuronsäure in den Harn gebildet haben, da die von mir angewandte Zersetzung des Harnstoffs mit Phosphorsäure bei Anwesenheit von größeren Mengen Kohlehydrat auf Kosten des Harnstoffs zur Bildung unlöslicher stickstoffhaltiger „Melanine" führt [Samuely, Mörner*)], deren Stickstoff sich in der Aminosäurefraktion findet.

Bei Injektion der Monaminosäuren wich ich von dem meist geübten Verfahren (Injektion in die vena jugularis oder in die Schenkelvene) ab und spritzte die Lösungen nach dem Beispiele der Bakteriologen in die Ohrvenen des Tieres ein. Immer wurden möglichst konzentrierte Lösungen angewandt, um nicht durch Einführen von zu großen Wassermengen die Diurese zu beeinflussen.

Zur Anwendung kamen reine Präparate von Glykokoll, Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Phenylalanin, Tyrosin und Leucin. Die ersten vier Präparate stammten von Merck. Reines Phenylalanin verdankte ich der Güte von Herrn Dr. E. Friedmann, reines Tyrosin Herrn Schneider, Assistenten des hiesigen Institutes, und reines Leucin stellte ich mir durch Verseifen eines von letzterem mir freundlichst überlassenen Präparates von Leucinäthylester dar, der nach der Methode von E. Fischer**) gewonnen war. Injiziert wurde immer eine abgemessene Menge der Lösungen, nachdem durch zwei Kjeldahlbestimmungen deren Konzentration ermittelt war.

Die Untersuchung des Harnes auf seinen Gehalt an Harnstoff und Monaminosäuren wurde im allgemeinen nach der von Pfaundler***) angegebenen Weise ausgeführt. Es war dies schon dadurch geboten, daß oft so geringe Mengen Harn erhalten wurden, daß sie gerade zu je zwei Bestimmungen des gesamten nicht basischen und des Harnstoffstickstoffs ausreichten.

Ein Teil Harn wurde meist mit 2 Teilen destillierten Wassers und 2 Teilen der Pfaundlerschen Phosphorwolframsäure-Salzsäurelösung ver-

---

*) Samuely, Diese Beiträge 2, 381; Mörner, Skandinav. Arch. für Physiol. 14, 297.

**) Über die Ester der Aminosäuren. Berichte d. deutsch. chem. Ges. 34, 1, 433f.

***) Zeitschr. f. physiol. Chemie 30, 75.

setzt und blieb in gut verschlossenen Flaschen bis zum nächsten Tage stehen. Dann filtrierte oder pipettierte ich die klare Flüssigkeit über dem Niederschlage ab und benutzte je 10 ccm zur Bestimmung des gesamten nicht basischen Stickstoffs nach Kjeldahl mit der von C. Neuberg*) angegebenen Modifikation. Weitere je 20 ccm wurden in Kjeldahlkolben mit je 10 g kristallisierter Phosphorsäure versetzt und auf 5 bis 24 Stunden in einen Wärmeschrank (Temperatur 150°) gebracht, nachdem ich mich davon überzeugt hatte, daß die Dauer des Erwärmens von 5 bis 48 Stunden keine Differenz in den Stickstoffzahlen gab. Wenn sodann die Flüssigkeit mit stickstofffreier Natronlauge und einem Überschuß von Magnesia usta alkalisch gemacht worden war, wurden Destillation und Titration in üblicher Weise zu Ende geführt.

Die starke Verdünnung des Harnes wurde vorgenommen, um die Menge des Niederschlages im Verhältnis zum Filtrat so gering zu machen, daß die gefundenen Stickstoffzahlen unter Vernachlässigung des Niederschlagvolumens direkt auf den Harn (= $^1/_5$ des Filtrates) umgerechnet werden konnten.

Nach Krüger und Schmidt**) soll es zweckmäßiger sein, für jede Harnprobe die zur Ausfällung nötige Menge Phosphorwolframsäure vorher zu bestimmen oder man soll nach Camerers***) Rat die Harne auf ein gleiches spezifisches Gewicht bringen und dann mit der ein für allemal bestimmten Menge salzsaurer Phosphorwolframsäurelösung die Fällung vornehmen. Doch dürften bei den mit destilliertem Wasser auf das dreifache Volumen aufgefüllten Harnen die spezifischen Gewichte nur noch wenig differieren; auch hätte mir nicht immer hinreichend Harn zu den von Krüger und Schmidt angegebenen Versuchen zur Verfügung gestanden.

Bei den großen Ausschlägen, die die Einführung der Monaminosäuren in der Verteilung des Stickstoffs veranlaßte, kann eine etwa aus dem Unterlassen dieser Vorversuche entspringende Ungenauigkeit keine Bedeutung beanspruchen.

Was die Beobachtung Camerers anlangt, daß bei längerem Stehen der Phosphorwolframsäurefiltrate sich ein neuer Niederschlag bildet, so kann ich dem beipflichten, doch mit der Einschränkung, daß derselbe in den ersten Tagen beim Kaninchenharne äußerst gering ist, ja sehr oft ganz fehlt, sodaß man ruhig die Stickstoffwerte, die man 1 bis 2 Tage nach dem Tierexperimente erhält, miteinander vergleichen kann. Überdies haben die Kontrollbestimmungen, die einen Tag später angestellt wurden, gute Übereinstimmung ergeben.

In den anzuführenden Tabellen sind die für Harnstoffstickstoff gefundenen Zahlen durch doppelte und mehrfache Analysen ermittelt.

Strenggenommen bestimmt das Verfahren von Pfaundler (s. dort) in der von mir durchgeführten Weise nur jenen Stickstoff,

*) Diese Beitr. **2**, 214.

) Zeitschr. f. physiol. Chemie **31, 556.

***) Zeitschr. f. Biol., Neue Folge **25**, 1, 67.

der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar, aber durch Erhitzen mit Phosphorsäure auf 150° in Form von Ammoniak abspaltbar ist. Da das Ammoniak des nativen Harnes vorher mit Phosphorwolframsäure neben Kreatinin, Purinbasen, Harnsäure usw. ausgefällt ist, so deckt sich dieser Stickstoffanteil fast genau mit dem Stickstoff des Harnstoffs. Daher bezeichne ich ihn schlechtweg als Harnstoffstickstoff. Den mit Phosphorsäure nicht abspaltbaren Rest von dem durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stickstoff nenne ich kurz Aminosäurenstickstoff, weil in diesem in der Norm sehr kleinen Anteil der Stickstoff der im Körper unzersetzt gebliebenen Aminosäuren enthalten sein muß. Dabei soll nicht verkannt werden, daß im normalen Harn dieser fester gebundene Stickstoff vermutlich nur zu einem kleinen Teil wirklich den Aminosäuren, vor allem dem Glykokoll, bzw. der Hippursäure angehört.

Von der Brauchbarkeit des Verfahrens zur Bestimmung des Aminosäurenstickstoffs habe ich mich übrigens neuerdings durch Kontrollversuche überzeugt. Eine Ausfällung der Monaminosäuren durch den angewandten Zusatz von Phosphorwolframsäure ist bei der im Harn gegebenen Konzentration, zumal bei der angewandten Verdünnung, ausgeschlossen. Hingegen verrät sich ihre Anwesenheit in dem Phosphorwolframsäurefiltrat bei Zusatz der Kjeldahlsäure. Es trat in den Proben, die sich hinterher bei der Analyse als aminosäurehaltig erwiesen, ein bedeutender Niederschlag auf, während er fast in allen „Normal“proben ganz fehlte.

Bei jedem Versuche wurde zuerst eine Normalprobe untersucht, d. h. eine Probe des vor der Injektion erhaltenen Harnes, um sie mit den später gewonnenen vergleichen zu können. Dieser Harn wurde derart erhalten, daß am Abend vor dem Versuche die Blase des Tieres entleert, dann das Tier in den Käfig gesetzt und am nächsten Morgen katheterisiert wurde. Gleich darauf ließ ich die Injektion folgen und entnahm im Laufe des Tages mehrere Urinproben.

Um ein klares Bild von dem Verlaufe der Stickstoffausscheidung zu gewinnen, habe ich die erhaltenen Zahlen einmal auf die pro Stunde, andererseits auf die pro 1 ccm Harn entfallende Stickstoffausfuhr umgerechnet.

II.

Versuche.

1. Monaminomonokarbonsäuren.

A. Glykokoll.

Vor der ersten Injektion untersuchte ich vier Proben des Harnes, um mich von den normalen Schwankungen der Harnstoff- und Monamino-

säurezahlen zu überzeugen. Dann injizierte ich 0,1123 g Glykokoll in 4,5 ccm destilliertem Wasser gelöst (20,97 mg N):

Anfang Mai 1903.

Zeit	Harnmenge	in 1 Stunde		Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickstoff	in 1 ccm			Bemerkungen
		Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickstoff			Nicht basischer Stickstoff	Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickstoff	
Stdn.	ccm	mg	mg	Proz.	Proz.	mg	mg	mg	
$8^1/_4$	21	21,564	4,217	83,6	16,4	10,132	8,476	1,657	
$13^1/_2$	41,6	26,387	4,898	84,2	15,8	10,15	8,554	1,596	
$4^1/_2$	27	55,49	8,453	86,8	13,2	10,657	9,249	1,409	
$21^1/_2$	ca. 54	36,621	5,397	87,6	12,4	16,73	14,63	2,1	
5	10,3	22,248	3,708	85,7	14,3	12,6	10,8	1,8	Injektion von 0,112 g Glykokoll
$16^1/_2$	43	41,21	3,010	93,6	6,4	16,975	15,82	1,155	
11	25	25,622	2,766	90,2	9,8	12,495	11,278	1,217	

Unter gewöhnlichen Verhältnissen schwanken die Harnstoffzahlen zwischen 83,6 und 87,6 Proz. Es muß daher ein Ansteigen bis auf 93,6 Proz. nach der Injektion auf eine Umwandlung von Glykokoll in Harnstoff bezogen werden, um so mehr, als in den absoluten Monaminosäurezahlen gar keine Steigerung zu erkennen ist.

Bei einem zweiten Versuche mit etwas mehr Glykokoll (1,48 g = 276,95 mg Stickstoff) wurde ein ganz ähnlicher Verlauf beobachtet.

27.—28. Mai.

Zeit	Harnmenge	in 1 Stunde		Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickstoff	in 1 ccm			Bemerkungen
		Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickst.			Nichtbasischer Stickst.	Harnstoff-Stickst.	Monaminosäure-Stickst.	
Stdn.	ccm	mg	mg	Proz.	Proz.	mg	mg	mg	
—	28	—	—	78,6	21,4	2,607	2,044	0,563	
$3^3/_4$	61	21,634	5,552	73,8	26,2	1,33	0,989	0,341	
$3^1/_4$	18	16,767	4,749	77,5	22,5	3,885	3,027	0,857	Injektion von 1,48 g Glykokoll
$4^1/_4$	54	23,396	5,67	79,7	20,3	2,292	1,846	0,446	
$13^1/_4$	225	26,165	4,16	85,6	14,4	1,785	1,54	0,245	

Auch hier ein deutliches Ansteigen der absoluten und relativen Harnstoffzahlen; aber keine nennenswerte Vermehrung der Monaminosäuren.

Versehentlich wurde das Tier kurz vor Beginn des Versuches mit Gras gefüttert. Während des Versuchsvormittags bekam es nichts zu fressen — erst wieder gegen Abend Rüben. Vielleicht hatte die Grasfütterung einen Einfluß auf den Normal-Stickstoff gehabt und die etwas höheren Monaminowerte verschuldet.

Bisher hatte das Tier kein unverändertes Glykokoll ausgeschieden. Infolgedessen wurde ein dritter Versuch mit einer großen Dosis (5,06 g) Glykokoll (944,5 mg Stickstoff) angestellt:

22. 25. Juni.

Zeit	Harnmenge	in 1 Stunde		Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickst.	in 1 ccm			Bemerkungen
		Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickst.			Nichtbasischer Stickst.	Harnstoff-Stickst.	Monaminosäure-Stickst.	
Stdn.	ccm	mg	mg	Proz.	Proz.	mg	mg	mg	
$15^1/_2$	38	16,861	4,118	80,3	19,7	8,557	6,877	1,68	
$4^2/_3$	35	16,012	38,062	29,6	70,4	7,21	2,135	5,075	Injektion von 5,06 g Glykokoll
$5^1/_4$	9,5	19,095	10,545	65,9	34,1	16,38	10,552	5,827	
$17^1/_2$	35	31,185	3,15	90,7	9,3	17,167	15,592	1,575	
23	110	53,565	4,640	91,2	8,8	11,2	10,230	0,970	

In den ersten 10 Stunden fand vornehmlich eine gesteigerte Ausscheidung von Monaminosäuren (Glykokoll) statt, sodaß die unverändert bleibenden Harnstoffmengen pro Stunde nur einen verhältnismäßig sehr geringen Bruchteil des nicht basischen Stickstoffs ausmachen. Dann aber kehrte sich das Verhältnis um; und während die Monaminosäuren zu normalen Werten zurückgekehrt sind, steigen die Harnstoffzahlen zu mehr als dem Dreifachen der sonst pro Stunde beobachteten Menge an.

In der Monaminosäurefraktion wurden 190 mg Stickstoff mehr ausgeschieden, was 1,016 g Glykokoll entspricht. Das Tier vermochte also bei 3 kg Körpergewicht 4,044 g Glykokoll zu zerstören oder in irgend einer Weise festzuhalten, eine Menge, die von keiner anderen Monaminosäure, wie wir sehen werden, erreicht wird. Die große Glykokolldosis steigerte in diesem Falle die Gesamt-Stickstoffausscheidung der nächsten Tage — doch war diese Steigerung schon am 5. Tage abgeklungen.

B. Alanin.

Die Versuchsreihe mit Alanin (Injektion von 3,02 g = 470 mg Stickstoff) lieferte folgendes Resultat:

17.—18. Juni.

Zeit	Harnmenge	in 1 Stunde		Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickst.	in 1 ccm			Bemerkungen
		Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickst.			Nicht basischer Stickst.	Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickst.	
Stdn.	ccm	mg	mg	Proz.	Proz.	mg	mg	mg	
14 1/3	70	18,72	3,758	83,3	16,7	4,602	3,832	0,769	
3	13	16,588	19,885	45,5	54,5	8,417	3,828	4,589	Injektion von 3,02 g Alanin
3 1/4	18	29,464	9,692	76	24	7,07	5,32	1,75	
4 3/4	60	35,7	8,952	80,7	19,3	3,535	2,826	0,708	

Sie ergibt zuerst vermehrte Monaminosäureausscheidung, dann aber — und hierdurch unterscheidet sich Alanin vom Glykokoll — nur langsam absinkende Monaminosäurewerte, denen (bis zum doppelten der normalen Menge erhöhte) Harnstoffausscheidung parallel geht.

C. Leucin.

Die Löslichkeit von reinem Leucin in Wasser ist bekanntlich sehr gering. Doch gelang es in etwa 40 ccm heißem Wasser 1,13 g Leucin (genauer 120,6 mg Stickstoff) unter Zusatz von Natriumkarbonat zu lösen und warm zu injizieren. Es ergaben sich folgende Werte:

23.—25. Juli.

Zeit	Harnmenge	in 1 Stunde		Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickst.	in 1 ccm			Bemerkungen
		Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickst.			Nicht basischer Stickst.	Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickst.	
Stdn.	ccm	mg	mg	Proz.	Proz.	mg	mg	mg	
15	357	30,404	7,497	85,8	14,2	1,592	1,277	0,315	
5 2/3	61	20,797	7,837	75,3	24,7	2,66	1,932	0,728	Injektion von 1,13 g Leucin
3 11/12	62,4	47,953	1,673	97,0	3	3,115	3,01	0,105	
15	179	36,187	4,5	89,2	10,8	3,404	3,032	0,377	
3 1/12	70	47,403	4,245	91,5	8,5	2,275	2,088	0,187	

Auch hier folgt der Injektion eine bedeutende Zunahme der Harnstoffzahlen, reichlich genug, um den Verbleib der injizierten 120 mg Stickstoff zu erklären. (Der relativ hohen Monaminosäurezahl in der ersten Probe nach der Injektion möchte ich deswegen weniger Wert beilegen, weil unmittelbar darauf eine so sehr kleine Zahl folgt.)

Es dürfte wegen der Schwerlöslichkeit des Leucins schwer fallen, dem Tiere Leucin in einer solchen Menge beizubringen,

daß es etwas davon unverändert ausschiede. Injizierte man aber mehrmals am Tage, so hätte die Vergleichbarkeit des Versuches Schaden gelitten. Ich habe daher auf weitere Leucinversuche verzichtet. Bei der großen Wichtigkeit gerade dieser Aminosäure soll sie Gegenstand einer speziellen Untersuchungsreihe bilden.

2. Monaminodikarbonsäuren.

Die Monaminodikarbonsäuren wurden in Form ihrer Natriumsalze injiziert.

A. Asparaginsäure.

Bei Injektion von 3,9 g Asparaginsäure (413,15 mg Stickstoff) ergab sich folgendes:

3.—5. Juni.

Zeit	Harnmenge	in 1 Stunde		Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickst.	in 1 ccm			Bemerkungen
		Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickst.			Nicht basischer Stickst.	Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickst.	
Stdn.	ccm	mg	mg	Proz.	Proz.	mg	mg	mg	
14 1/2	41	5,337	0,624	89,2	10,8	2,072	1,855	0,217	
7	28	3,15	2,87	52,5	47,5	1,505	0,787	0,717	Injektion v. 3,9g Asparaginsäure
3 3/4	36	8,4	10,92	43,7	56,3	2,012	0,875	1,137	
14	49	12,47	2,474	84,7	15,3	4,27	3,563	0,707	
9 1/2	24	9,616	1,303	88,5	11,5	4,322	3,806	0,516	

Zuerst eine Zunahme der Monaminosäureausscheidung, der nur ein sehr langsames Herabsinken zu den normalen Werten folgt. Die gleichzeitige Umwandlung von Asparaginsäure in Harnstoff geht ebenfalls nur langsam vor sich. Eng schließt sich an die Asparaginsäure an die

B. Glutaminsäure,

von der 1,58 g (151 mg Stickstoff) in 27 ccm Lösung in etwa 5 Minuten injiziert wurden.

29.—30. Juli.

Zeit	Harnmenge	in 1 Stunde		Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickst.	in 1 ccm			Bemerkungen
		Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickst.			Nicht basischer Stickst.	Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickst.	
Stdn.	ccm	mg	mg	Proz.	Proz.	mg	mg	mg	
13 1/2	345	47,53	17,074	75	25	2,45	1,802	0,647	
?	61	—	—	56	44	2,228	1,234	0,994	Injektion von 1,58 g Glutaminsäure.

Auch hier zeigt die erste Probe nach der Injektion eine ganz bedeutende relative Abnahme des Harnstoffstickstoffs.

Dieser Versuch mit Glutaminsäure, der letzte in der zeitlichen Folge, nahm wegen des nach einigen Stunden erfolgten Todes des Versuchstieres ein vorzeitiges Ende. Vielleicht war die durch ein Versehen veranlaßte zu starke Alkaleszenz der Lösung die Todesursache.

3. Aromatische Monaminosäuren.

A. Phenylalanin.

Die nach Injektion von 1,179 g Phenylalanin (100 mg Stickstoff) eintretende Steigerung des Monaminosäure-Stickstoffs ist absolut und relativ soviel größer als die des Harnstoff-Stickstoffs, daß man annehmen kann, daß der größte Teil des Phenylalanins nicht in Form von Harnstoff ausgeschieden wurde.

27.—29. Juni.

Zeit	Harnmenge	in 1 Stunde		Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickst.	in 1 ccm			Bemerkungen
		Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickst.			Nicht basischer Stickst	Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickst.	
Stdn.	ccm	mg	mg	Proz.	Proz.	mg	mg	mg	
16	50	12,851	1,476	91,3	8,7	4,585	4,112	0,472	
6	84,5	20,579	9,981	69,5	30,5	2,17	1,461	0,709	Injektion von 1,179 g Phenylalanin
$4^1/_2$	?	—	—	82,5	17,5	2,03	1,68	0,35	
$24^1/_4$	100	13,17	1,984	86,9	13,1	3,675	3,193	0,481	

Die Steigerung des Harnstoffes in der ersten Probe nach der Injektion wird durch die gesteigerte Diurese genügend erklärt.

B. Tyrosin.

Wegen dessen Schwerlöslichkeit konnten nur 0,543 g Tyrosin (entsprechend 42 mg Stickstoff) injiziert werden.

15.—16. Juli.

Zeit	Harnmenge	in 1 Stunde		Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickst.	in 1 ccm			Bemerkungen
		Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickst.			Nicht basischer Stickst.	Harnstoff-Stickstoff	Monaminosäure-Stickst.	
Stdn.	ccm	mg	mg	Proz.	Proz.	mg	mg	mg	
2^{35}	117	84,014	23,778	80,4	19,6	2,38	1,855	0,525	
3^{10}	90	64,8	27,568	71,2	28,8	3,255	2,283	0,971	Injektion von 0,543 g Tyrosin
4^{10}	240	79,269	35,642	72,4	27,6	1,995	1,376	0,619	
13	430	62,515	9,426	90,0	10,0	2,175	1,890	0,285	400 ccm abgemessen, etwa 30 verloren.

Entsprechend den Schwankungen in der Diurese gehen auch die Harnstoffzahlen auf und nieder. Bei gleichzeitiger Betrachtung der relativen und absoluten Monaminosäurewerte erkennt man jedoch, daß trotz der geringen verwendeten Substanzmengen auch hier keine Mehrausscheidung von Harnstoff stattgefunden haben kann.

III.

Schlußbemerkungen.

Wenn man die angeführten Versuchsreihen miteinander vergleicht, so fällt der bedeutende Unterschied in dem Verhalten der einzelnen Substanzen auf. Denn es gibt unter den Monaminosäuren

1. solche, die innerhalb der Versuchszeit keine sicher erkennbare Harnstoffvermehrung veranlassen (die aromatischen Monaminosäuren: Tyrosin und Phenylalanin);
2. solche, die wohl die Menge des Harnstoffstickstoffs steigern, bei denen aber daneben Mehrausscheidung in der Monaminosäurefraktion eintritt: Alanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure. Auch das Cystin gehört, nach seinem von L. Blum*) untersuchten Verhalten zu schließen, dieser Gruppe an;
3. solche, die so rasch im Körper zerlegt werden, daß nur nach Injektion sehr großer Mengen, einer förmlichen Überschwemmung des Organismus, eine überdies rasch vorübergehende Ausscheidung von schwer abspaltbarem Stickstoff eintritt, während der Harnstoff-Stickstoff eine anhaltende Steigerung erfährt: Glykokoll und anscheinend auch Leucin.

Natürlich kann es sich hier nicht um ganz scharfe Grenzen handeln. Diese Gruppierung soll nur den Überblick erleichtern. Ein abschließendes Urteil über die Zersetzbarkeit der einzelnen Aminosäuren wird wohl erst möglich sein, wenn man über eine größere Anzahl von Versuchsreihen verfügt, vornehmlich solcher, bei denen einerseits die Einführung genau gleicher Gewichtsmengen, andererseits äquimolekularer Mengen vorgenommen würde.

Genauere Vorstellungen über den Weg, auf dem der Abbau der Aminosäuren erfolgt, lassen sich aus meinen Versuchen nicht gewinnen.

---

*) Diese Beiträge 5, 1.

Läßt sich auch vermuten, daß dieser Abbau zunächst durch Übergang von Aminosäuren in Oxysäuren erfolgt, — dafür spricht die Fähigkeit der Bakterien, eine solche Stickstoffabspaltung einzuleiten und der Übergang von Tyrosin und Phenylalanin in Homogentisinsäure bei Pflanzenkeimlingen und beim Alkaptonuriker — so ist für den Tierkörper ein solcher Vorgang doch noch nicht als der normal stattfindende nachgewiesen.

Ganz besonders fraglich bleibt aber, ob die Abspaltung des Stickstoffs — die zur Harnstoffbildung führt — sofort zu einem weiteren Zerfall, einer Verbrennung des stickstofffreien Kohlenstoffkomplexes führt — oder ob nicht gerade dieser das geeignete Material für den Aufbau anderer stickstofffreier Stoffe bildet.

III.

Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide.

Dritte Mitteilung.

Irreversible Eiweißfällungen durch Elektrolyte.

Von Dozent Dr. **Wolfgang Pauli.**

(Ausgeführt mit Unterstützung der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften.)

(Aus dem Institute für allgemeine und experimentelle Pathologie in Wien. Vorstand: Prof. R. Paltauf.)

Ein nicht minder großes Interesse als die in der vorigen Abhandlung[1]) mitgeteilten und in mancher Richtung zu ergänzenden Beziehungen der nativen Eiweißstoffe zu den Neutralsalzen der Alkalimetalle (und des Magnesiums) beanspruchen deren Reaktionen mit den Salzen der sogenannten Erdalkalien, Kalzium, Baryum und Strontium. So wie die letzteren sowohl gegen die Alkalien als auch gegen andere Metalle hinsichtlich Basizität, Löslichkeit der Salze u. s. f. eine genügend scharf charakterisierte Gruppe bilden, so kommt ihnen auch nach ihrem Verhalten zu den Eiweißkörpern eine besondere Stellung zu. Die von ihnen hervorgebrachten Zustandsänderungen sind im Gegensatze zu den von den Neutralsalzen der Leichtmetalle erzeugten irreversibel, d. h. durch die einfache Umkehr der Bildungsbedingungen nicht mehr rückbildungsfähig. Gleichzeitig bestehen jedoch, wie hier vorweggenommen werden soll, deutliche Unterschiede gegenüber dem Verhalten der übrigen, irreversible Eiweißabscheidung erzeugenden Salze, z. B. des Zn, Fe, Cu, Ag, Hg, Pb usw. Während nämlich bei den letzteren die Rolle der Kationen so stark in den Vordergrund rückt, daß schon sehr geringe Salzkonzentrationen fast unabhängig von der Natur des Anions fällend

wirken, entscheidet bei den Erdalkaliverbindungen ähnlich wie bei den Salzen des Na, K, NH_4 und Mg die Natur der Anionen in bedeutendem Maße mit über das Fällungsvermögen. Daher besitzen sie gleich den Salzen der Alkalien relativ hohe Fällungsgrenzen oder ermangeln selbst in der höchsten erreichbaren Konzentration überhaupt der Fähigkeit, Eiweiß niederzuschlagen. Ihr Studium läßt somit neben manchem biologischen Ausblick auch eine tiefere Erkenntnis jener besonderen Fälle erhoffen, in denen es bei Anwesenheit von Salzen der Alkalien zum Auftreten irreversibler Zustandsänderungen kommt und vermittelt zugleich den Übergang zu den komplizierteren Reaktionen der übrigen Schwermetalle mit Proteinsubstanzen.

Methodisch sind die Versuche nach Art der früheren angeordnet, die Salze in Normal-Konzentration bei konstanter Flüssigkeitsmenge (10 ccm) und gleichem Gehalt an klarer, frisch bereiteter, durch Schlagen von faserigen Beimengungen befreiter Eiweißlösung (2 ccm). Nur auf die Bildung von Trübungen durch Niederschläge des Kalziums, Strontiums und Baryums mit den Sulfaten, Phosphaten und Karbonaten des Eierklars mußte geachtet werden.

Vorbehandlung der konzentrierten Eiweißlösung mit etwas Baryumchlorid und Abfiltrieren der auftretenden Trübung erwies sich als ungeeignet. In der konzentrierten Eiweißlösung wird nämlich die quantitative Entstehung unlöslicher Barytniederschläge gehemmt und die unorganischen Erdalkalifällungen machen sich bei der Verdünnung im Versuche dennoch geltend. Hingegen zeigte sich, daß diese Niederschläge bei Anwendung hoher Konzentrationen der Erdalkalisalze (insbesondere bei Kalzium) viel schwächer waren als bei niederen, wodurch ein großer Teil der Versuche erleichtert wurde. Die unlöslichen Salze sind zudem durch ihre grauweiße Farbe im Gegensatze zu der bläulichweißen der Eiweißniederschläge und durch ihren Charakter als staubförmige, rasch sich absetzende, nach 24 Stunden zu einigen Flöckchen verklumpende Trübung kenntlich. Übrigens wurden stets gleichzeitig geeignete Kontrollproben hergestellt und die erreichte Fällungsgrenze für Eiweiß durch das Auftreten mächtiger flockiger Fällungen bei weiterem Steigern des Salzgehaltes charakterisiert.

Im folgenden sind die Versuche mit Kalziumchlorid etwas eingehender, die mit den übrigen Verbindungen nur teilweise wiedergegeben, um überflüssige Wiederholungen zu vermeiden. Kalziumchlorid wurde zum Teil körnig und frisch getrocknet, zum Teil schön kristallisiert (unter Rücksichtnahme auf das Kristallwasser) verwendet. Wegen seiner Hygroskopie wurde stets die gesamte Menge für eine Versuchsreihe gewogen, gelöst und die Lösung auf die einzelnen Reagenzröhrchen verteilt. In den Versuchstabellen ist sowohl die Zustandsänderung kurz nach dem Mischen,

als auch nach 24 Stunden angegeben, wodurch ein gewisser Überblick über die Reaktionsgeschwindigkeit ermöglicht ist. Für die Beurteilung eines Salzes ist jedoch im allgemeinen nur der nach 24 Stunden erreichte Endzustand benutzt, da sich leicht unvermeidbare andere Einflüsse auf den anfänglichen Reaktionsverlauf, wie Temperaturänderungen durch die Lösung der Salze oder unvollkommene Mischung mit dem Eiweiß, störend geltend machen.

Die Fällungsgrenze des Kalziumschlorides wurde für das kristallisierte Präparat mit 8,8 normal, für das wasserfreie Präparat mit 9,0 bis 9,2 festgestellt. Bei dieser Konzentration tritt sofort eine zarte bläuliche Trübung auf, die nach 24 Stunden dickmilchig wird. Für ein mit Baryumchlorid vorbehandeltes Eiweiß liegt die Fällungsgrenze etwas tiefer.

A. Einfluß verschiedener Ionen auf die Erdmetalleiweißfällung.

I. $CaCl_2 + NaC_2H_3O_2$, NaCl, $NaNO_3$, NaBr, NaJ, NaCyS.

Salze	Zustandsänderung nach 10′	Zustandsänderung nach 24^h	Salze	Zustandsänderung nach 10′	Zustandsänderung nach 24^h
1. 7,8 $CaCl_2$	klar	klar	8. 1,0 $CaCl_2$	sehr zarte Trübung	zarte Trübung z. T. abgesetzt
2. 7,8 $CaCl_2$ + 1,0 $NaC_2H_3O_2$	klar, einige Kristalle ungelöst	fast klar	9. 1,0 $CaCl_2$ + 1,0 $NaC_2H_3O_2$	fast klar	zarte Trübung abgesetzt
3. 7,8 $CaCl_2$ + 1,0 NaCl	klar	zarte Trübung	10. 1,0 $CaCl_2$ + 1,0 NaCl	zarte Trübung	Trübung großenteils abgesetzt
4. 7,8 $CaCl_2$ + 1,0 $NaNO_3$	klar	fast klar	11. 1,0 $CaCl_2$ + 1,0 NaBr	zarte Trübung	zarte Trübung
5. 7,8 $CaCl_2$ + 1,0 NaBr	milchige Trübung	dicke Fällung	12. 1,0 $CaCl_2$ + 1,0 NaJ	feinmilchige Trübung	milchige schwebde. Trübung
6. 7,8 $CaCl_2$ + 1,0 NaJ	dicker milchiger Niederschlag	dicke Fällung	13. 1,0 $CaCl_2$ + 1,0 NaCyS	feinmilchige Trübung	dickmilchige Trübung
7. + 7,8 $CaCl_2$ 1,0 NaCyS	dicke milchige Fällung	dicke Fällung			

$CaCl_2$ wasserfrei gelöst und mit der Pipette verteilt, die übrigen Salze in Substanz. 2 ccm Eiweißlösung mit $BaCl_2$ vorbehandelt, 8 ccm Wasser.

In einer nicht weit von der Fällungsgrenze gelegenen Konzentration wirkt Chlorkalzium bei Anwesenheit von Natriumbromid und -jodid zunehmend eiweißfällend. Die entstehenden Fällungen sind irreversibel.

Auch bei einer tief unter der Fällungsgrenze befindlichen Konzentration (1,0 $CaCl_2$) tritt eine irreversible Fällung durch gleichzeitig anwesendes Natriumjodid und -rhodanid auf, welche merklich schwächer ist als bei hohem Chlorkalziumgehalt.

II. $CaCl_2 + NH_4C_2H_3O_2$, NH_4Cl, NH_4NO_3, NH_4Br, NH_4J, NH_4CyS.

Salze	Zustandsänderung		Salze	Zustandsänderung	
	sofort	nach 24h		sofort	nach 24h
1. 1,0 $CaCl_2$	klar	sehr zarte Trübung	8. 8,0 $CaCl_2$	klar	klar
2. 1,0 $CaCl_2$ 1,0 $NH_4C_2H_3O_2$	klar	klar	9. 8,0 $CaCl_2$ 1,0 $NH_4C_2H_3O_2$	großenteils unlöslich	
3. 1,0 $CaCl_2$ + 1,0 NH_4Cl	klar	klar	10. 8,0 $CaCl_2$ + 1,0 NH_4Cl	klar	klar
4. 1,0 $CaCl_2$ + 1,0 NH_4NO_3	klar	klar	11. 8,0 $CaCl_2$ + 1,0 NH_4NO_3	klar	klar
5. 1,0 $CaCl_2$ + 1,0 NH_4Br	klar	klar	12. 8,0 $CaCl_2$ + 1,0 NH_4Br	fein-milchige Trübung	milchige Trübung
6. 1,0 $CaCl_2$ + 1,0 NH_4J	klar	klar	13. 8,0 $CaCl_2$ + 1,0 NH_4J	dicke opake Fällung	dicke opake Fällung
7. 1,0 $CaCl_2$ + 1,0 NH_4CyS	klar	fein-milchige Fällung	14. 8,0 $CaCl_2$ + 1,0 NH_4CyS	dicke opake Fällung	dicke opake Fällung

Alle Salze in Substanz, 8 ccm Wasser, 2 ccm Eiweiß mit $BaCl_2$ vorbehandelt.

Die Ammoniumsalze verhalten sich bei hoher Chlorkalziumkonzentration analog den Natriumsalzen, indem das Bromid, Jodid und Rhodanid Fällungen auslösen.

Bei niederem Kalziumchloridgehalte ist jedoch die fällungserzeugende Eigenschaft nur am Rhodanammonium nachweisbar und bleibt selbst für das Jodid gänzlich aus. Für die gleichen Anionen erscheinen also die Natriumverbindungen als mächtigere Fällungserreger wie die Ammonsalze.

III. $CaCl_2$ + NaCl, $NaNO_3$, NH_4Cl, NH_4NO_3, $MgCl_2$, $Mg(NO_3)_2$, $MgBr_2$, $Mg(CyS)_2$.

Salze	Zustandsänderung nach 10′	Zustandsänderung nach 24h	Salze	Zustandsänderung sofort	Zustandsänderung nach 24h
1. 8,8 $CaCl_2$ + 1,0 NaCl	opak milchig	opake feste Fällung	6. 9,0 $CaCl_2$ + 1,0 $MgCl_2$	klar	klar
2. 8,8 $CaCl_2$ + 1,0 $NaNO_3$	milchig durchscheinend	milchiger Niederschlag	7. 9,0 $CaCl_2$ *) + 1,0 $Mg(NO_3)_2$	fast klar	fast klar
3. 8,8 $CaCl_2$ + 1,0 NH_4Cl	feinmilchige Trübung	stärkere feinmilch. Fällung	8. 9,0 $CaCl_2$ *) + 1,0 $MgBr_2$	klar	feinmilch. Trübung
4. 8,8 $CaCl_2$ + 1,0 NH_4NO_3	feinmilchig	feinmilchig	9. 9.0 $CaCl_2$ + 1,0 $Mg(CyS)_2$	opake dickmilchige Fällung	opake Fällung
5. 8,8 $CaCl_2$	klar	zarte Trübung	10. 9,0 $CaCl_2$	klar	klar

$CaCl_2$ wasserfrei, Salze in Substanz, 8 ccm Wasser, 2 ccm natives Eiweiß.

Bei einem Chlorkalziumgehalte näher der Fällungsgrenze als in den obigen Versuchen wirken auch Chloride und Nitrate als Fällungserreger. Auch hier sind für das gleiche Anion Natriumsalze wirksamer als die des Ammoniums.

Von den Magnesiumverbindungen ist selbst bei noch höherer Kalziumchloridsättigung das Chlorid und Nitrat unwirksam. Nur das Bromid und insbesondere das Rhodanid befördern die Eiweißfällung durch Chlorkalzium. Für das gleiche Anion sind somit die Magnesiumsalze weniger kräftige Fällungserreger als selbst die des Ammoniums.

---

*) Wegen Trübung vor dem Eiweißzusatz durch kleine Filter geschickt.

IV. a) $CaCl_2$ mit Na- und K-Salzen.
b) $CaCl_2$ mit Ba- und Sr-Salzen.

Salze a	Zustandsänderung sofort	Zustandsänderung nach 24^h
1. 1,5 $CaCl_2$ + 1,0 $NaBr$	klar	klar
2. 1,5 $CaCl_2$ + 1,0 $NaCyS$	dick-milchig	dick-milchig
3. 1,5 $CaCl_2$ + 1,0 KBr	klar	klar
4. 1,5 $CaCl_2$ + 1,0 $KCyS$	dick-milchig	dick-milchig
5. 2,5 $CaCl_2$ + 1,0 $NaBr$	klar	fast klar
6. 2,5 $CaCl_2$ + 1,0 KBr	klar	fast klar
7. 8,5 $CaCl_2$ + 1,0 $NaNO_3$	fein-milchig	milchige opake Trübung
8. 8,5 $CaCl_2$ + 1,0 KNO_3	milchige Trübung	milchige opake Trübung
9. 8,5 $CaCl_2$ + 1,0 $NaCl$	zarte bläuliche Trübung	milchig durch-scheinend
10. 8,5 $CaCl_2$ + 1,0 KCl	zarte bläuliche Trübung	fein-milchig

Salze b	Zustandsänderung nach 15′	Zustandsänderung nach 24^h
1. 9,0 $CaCl_2$	klar	klar
2. 9,0 $CaCl_2$ + 1,0 $BaCh$	sehr zarte Trübung	zarte bläul. Trübung; einige Kristalle ungelöst
3. 9,0 $CaCl_2$ + 1,0 $Ba(NO_3)_2$	sehr zarte Trübung	zarte bläul. Trübung; einige Kristalle ungelöst
4. 9,0 $CaCl_2$ + 1,0 $SrCl_2$	milchige undurchs. Trübung	fest geronn. opaker Niederschlag
5. 9,0 $CaCl_2$ + 1,0 $Sr(NO_3)_2$	fein-milchige Trübung	milchige Trübung

Kalziumchlorid wasserfrei, Salze in Substanz zugesetzt, 8 ccm Wasser, 2 ccm natives Eiweiß.

Die Versuche mit Kaliumsalzen bestätigen die oben konstatierte Wirkung von Chloriden, Nitraten und Rhodaniden. Die Kaliumverbindungen stehen als Fällungserreger denen des Natriums nahe und sind wirksamer als die des Ammoniums und Magnesiums.

Auch die Chloride und Nitrate des Baryums und Strontiums verstärken die Fällungswirkung des hochkonzentrierten Kalziumchlorides (9,0) deutlich; das Baryum in geringem, das Strontium in hohem Maße.

V. $CaBr_2$, $Ca(CyS)_2$, $Ca(NO_3)_2$, $Ca(C_2H_3O_2)_2$.

Salze	Zustandsänderung sofort	Zustandsänderung nach 24h	Salze	Zustandsänderung sofort	Zustandsänderung nach 24h
1. 1,0 $CaBr_2$	fast klar	fast klar	9. 1,0 $Ca(C_2H_3O_2)_2$	sehr zarte Trübung	sehr zarte Trübung
2. 1,0 $CaBr_2$ + 1,0 NaCl	fast klar	fast klar	10. 1,0 $Ca(NO_3)_2$	sehr zarte Trübung	sehr zarte Trübung
3. 1,0 $CaBr_2$ + 1,0 $NaC_2H_3O_2$	fast klar	fast klar	11. 0,5 $Ca(CyS)_2$	zarte graue Trübung	klar, einige Flöckchen
4. 1,0 $CaBr_2$ + 1,0 $NaNO_3$	fast klar	fast klar	12. 1,0 $Ca(CyS)_2$	zarte Trübung	milchige Trübung
5. 1,0 $CaBr_2$ + 1,0 NaBr	fast klar	fast klar	13. 0,75 $CaCl_2$ + 0,75 NaCyS	zarte Trübung	fast klar, einige Flöckchen
6. 6,0 $CaBr_2$	graue zarte Trübung	zarte bläuliche Trübung	14. 1,0 $CaCl_2$ + 0,5 NaCyS	zarte graue Trübung	klar, einige Flöckchen
7. 4,0 $CaCl_2$ + 1,0 NaBr	fast klar	milchige Trübung	15. 1,0 $CaCl_2$ + 1,0 NaCyS	zarte Trübung	milchige Trübung
8. 5,0 $CaBr_2$ + 1,0 NaCl	fast klar	fast klar, einige Flöckchen	16. 2,0 $CaCl_2$ + 1,0 NaCyS	dickmilchige Fällung	milchig opak

Alle Salze in Substanz, 8 ccm Wasser, 2 ccm natives Eiklar.

Das Verhalten der übrigen Kalziumsalze entspricht im allgemeinen den am Kalziumchlorid festgestellten Wirkungen der verschiedenen Anionen. Die Fällungsgrenze des Kalziumrhodanides liegt am tiefsten (1,0), die des Bromides liegt höher (6,0), doch noch immer wesentlich tiefer als die des Chlorides. Die Kombination $CaCl_2$ + NaBr zeigte sich schon im Verhältnisse 4:1 der Komponenten sehr wirksam, während 5,0 $CaBr_2$ + 1,0 NaCl, welche Mischung annähernd die gleiche Zahl Natrium-, mehr Kalzium- und Brom-, wohl aber weniger Chlorionen enthält, das Eiweiß nicht niederschlägt.

Die Fällungsgrenze von Kalziumrhodanid liegt bei 1,0 n. Ebenso liegt der Fällungswert für die Kombination von $CaCl_2$ mit NaCyS bei 1,0. Sowohl bei sinkendem $CaCl_2$ als auch bei ab-

nehmendem NaCyS-Gehalt sinkt das Fällungsvermögen des Salzpaares, es steigt jedoch mit wachsendem $CaCl_2$-Gehalte.

Strontiumsalze.

Strontiumchlorid wirkt selbst in achtfacher Normalkonzentration (bei 40° C übersättigt) nicht eiweißfällend. Eine einfache Normallösung von Strontiumchlorid gibt mit 1,0 $NaC_2H_3O_2$, NaCl, $NaNO_3$, NaBr, NaJ, NaCyS kombiniert keine Eiweißfällung. Es ist somit schwächer als Kalziumchlorid (vgl. Tabelle I).

VI. $SrCl_2$ mit Na, NH_4 und Mg-Salzen.

Salze	Zustandsänderung sofort	Zustandsänderung nach 24h	Salze	Zustandsänderung sofort	Zustandsänderung nach 24h
1. 5,0 $SrCl_2$	fast klar	fast klar	9. 4,8 $SrCl_2$	klar	klar
2. 5,0 $SrCl_2$ + 1,0 $NaC_2H_3O_2$	fast klar	fast klar	10. 4,8 $SrCl_2$ + 1,0 NaBr	zarte Trübung	fein-milchige Trübung
3. 5,0 $SrCl_2$ + 1,0 NaCl	fast klar	fast klar	11. 4,8 $SrCl_2$ + 1,0 NaCyS	milchig	dick-milchige Fällung
4. 5,0 $SrCl_2$ + 1,0 $NaNO_3$	fast klar	fast klar	12. 4,8 $SrCl_2$ + 1,0 NH_4Br	klar	klar
5. 5,0 $SrCl_2$ + 1,0 NaBr	zarte wolkige Trübung	dicke milchige Trübung	13. 4,8 $SrCl_2$ + 1,0 NH_4CyS	milchig	dick-milchig
6. 5,0 $SrCl_2$ + 1,0 NaJ	dicke milchige Fällung	opakes festes Coagulum	14. 4,8 $SrCl_2$ + 1,0 $MgBr_2$	fast klar	fast klar
7. 5,0 $SrCl_2$ + 1,0 NaCyS	dicke milchige Fällung	opake Fällung	15. 4,8 $SrCl_2$ + 1,0 $Mg(CyS)_2$	milchig	dick-milchige Fällung
8. 5,0 $SrBr_2$	klar, nach 10' graue Trübung	zarte bläuliche Trübung neben abgesetzten Flöckchen			

Alle Salze in Substanz, 8 ccm Wasser, 2 ccm Eiweißlösung mit $BaCl_2$ vorbehandelt.

Bei der Kombination des Strontiumchlorides mit anderen Elektrolyten zeigen sich analoge Verhältnisse wie beim Kalziumchlorid. Bei höheren Konzentrationen (5,0 $SrCl_2$) wirken zugesetztes Bromid, Jodid und Rhodanid des Natriums als Fällungsverstärker.

Die entsprechenden Verbindungen des Ammoniums und Magnesiums stehen den Natriumsalzen als Fällungsvermittler bedeutend nach.

In fünffacher Normallösung wirken weder Azetat noch Nitrat des Strontiums eiweißfällend, nur das Bromid gibt eine Andeutung einer Fällungswirkung.

Baryumsalze.

Baryumchlorid ein- und vierfachnormal gibt nur feine, grauweiße, rasch sich setzende Niederschläge von unlöslichen Baryumsalzen, keine Eiweißfällung, auch nicht bei Sättigung. Die Eiweißniederschläge sind wolkig, bläulich, weniger schwer, und zeigen sich zum Unterschiede von anorganischen Barytfällungen nur bei Anwesenheit bestimmter Anionen neben dem Baryum.

VII. $BaBr_2$, BaJ_2, $Ba(CyS)_2$.

Salze	Zustandsänderung		Salze	Zustandsänderung	
	sofort	nach 24h		sofort	nach 24h
1. 1,0 $BaBr_2$	graue Trübung	klar, Niederschl. abgesetzt	4. 3,0 $BaBr_2$	graue Trübung	feine Trübung
2. 1,0 BaJ_2	graue Trübung	klar, Niederschl. abgesetzt	5. 3,0 BaJ_2	milchige bläuliche Trübung	fest geronnen. Niederschl.
3. 1,0 $Ba(CyS)_2$	graue Trübung	milchige Trübung abgesetzt Niederschl.	6. 3,0 $Ba(CyS)_2$	dick-milchiger weißer Niederschl.	opakes weißes Coagulum

Von den Baryumsalzen wirkt nur das Jodid und Rhodanid unzweifelhaft eiweißfällend. Vergleicht man $CaCl_2$, $BaCl_2$ und $SrCl_2$ in Kombination mit NaCyS, so tritt das stärkere Fällungsvermögen des Kalziums dem Baryum und namentlich Strontium gegenüber deutlich zutage.

Zusammenfassung der Versuchsergebnisse.

Wie es in den früheren Mitteilungen durchgeführt wurde, sollen auch die Resultate der Versuche mit den alkalischen Erden vorerst unabhängig von Hypothesen über die Natur des Fällungsvorganges betrachtet und mit den einschlägigen, unter entsprechenden Versuchsbedingungen gewonnenen experimentellen Tatsachen verglichen werden. Vor allem sind hier die Erfahrungen mit den Neutralsalzen der Alkalimetalle heranzuziehen. Wegen der Schwerlöslichkeit zahlreicher Erdalkaliverbindungen wie der Sulfate, Karbonate, Phosphate kann jedoch der Vergleich nicht auf der ganzen Linie durchgeführt werden und muß sich im wesentlichen auf die Salze mit einwertigen Anionen beschränken.

Zunächst zeigt es sich, daß die Chloride und Azetate der Erdalkalien erst in weit höheren Normalkonzentrationen fällend wirken als die entsprechenden Verbindungen der Alkalimetalle. Hingegen besitzen die Rhodanide, Jodide und Bromide der Kalziumgruppe schon zum Teil in relativ geringen Konzentrationen ein Fällungsvermögen, welches den entsprechenden Alkalisalzen für natives Eiweiß völlig abgeht. Sieht man ab von dem schon eingangs hervorgehobenen Unterschiede in der Reversibilität der Fällungen, so offenbaren sich noch weitere Abweichungen im Verhalten der Alkali- und Erdalkali-Eiweißniederschläge beim Studium der Salzkombinationen.

Bei den Neutralsalzen der Alkalimetalle hatte sich, wie in der letzten Mitteilung des Näheren ausgeführt worden ist, eine Scheidung in fällungshemmende und fällungsbefördernde Elektrolyte durchführen lassen, welche mit einer antagonistischen Wirkung der Salzionen zusammenhängt. Jedes Salz gehört, je nach dem Überwiegen der fällenden oder hemmenden Eigenschaft des einen Ion über das andere, zu den Eiweiß niederschlagenden oder lösenden Elektrolyten. So zählen z. B. NaCl, $NaNO_3$, NaBr zu den fällungsbegünstigenden, NaJ, NaCyS zu den lösenden Verbindungen. Zugleich wurde, gestützt auf einige Analogien, die vorläufige*) Annahme gemacht, daß die Kationen Träger des Fällungseffektes, die Anionen der Alkalisalze die des Hemmungseffektes sind. Die fällenden Kationen ordnen sich nach steigender Wirkung in der Reihe Mg, NH_4, K, Na, Li, die hemmenden Anionen nach abnehmendem Lösungsvermögen in der Folge CyS, J, Br, NO_3, Cl, $C_2H_3O_2$ u. s. f.

Stellt man die Ionen nach ihrer Wirkung auf die Eiweißfällung durch die Erdalkalien zusammen, so findet man, daß für dasselbe Kation zunehmend die Fällung verstärkt wird in der Reihenfolge $C_2H_3O_2$, Cl, NO_3, Br, J, CyS. Die Ordnung ist also genau umgekehrt wie bei den Fällungen von nativem Eiweiß durch die Neutralsalze der Alkalien. Bei gleichen Anionen der zuge-

*) Bei dieser Annahme würden sich die Eiweißkörper gegenüber allen Kationen sowohl den einfach als auch mehrfach elektrisch geladenen gleichartig verhalten. Für die Auffassung der Anionen als Träger der Fällungswirkung von Salzen der Alkalimetalle ließe sich anführen, daß hier vorwiegend, wenn auch nicht ausschließlich, die Verbindungen mit mehrwertigen Anionen Fällungserreger sind. Die Eiweißkörper würden sich dann im allgemeinen gegen mehrwertige Kationen elektronegativ, gegen mehrwertige Anionen elektropositiv verhalten. Eine strenge Entscheidung zwischen diesen Möglichkeiten ist gegenwärtig nicht zu treffen. Die hier gegebene Darstellung kann leicht der einen oder der anderen angepaßt werden.

setzten Elektrolyte wächst hingegen die Fällungsbegünstigung nach der Kationenreihe Mg, NH_4, K, Na, welche mit der für die reversiblen Neutralsalzfällungen ermittelten übereinstimmt. Die vorliegenden Verhältnisse lassen sich am besten mit der folgenden Annahme vereinen. Das durch die feste Verknüpfung mit den elektropositiven Erdalkaliionen*) veränderte Eiweiß wird im Gegensatze zum nativen durch Anionen in seiner Fällung befördert, durch die Kationen gehemmt. Diese Annahme steht mit anderweitigen experimentellen Erfahrungen in bestem Einklange.

Hardy[2]) hat gezeigt, daß sich die elektrischen Eigenschaften von koaguliertem Eiweiß umkehren, sobald es aus alkalischen in saure Medien gebracht wird. Bei Überwiegen der elektropositiven H-Ionen bewegt es sich zur Kathode, bei Überschuß der negativen OH-Ionen wird es gegen den Strom fortgeführt. Es verhält sich also selbst bald positiv bald negativ und Hardy hat auch die Beziehung zwischen elektrischer Ladung eines Kolloides und dem koagulierenden Ion durch das Gesetz ausgedrückt: Das koagulierende Ion hat immer das entgegengesetzte elektrische Zeichen wie das kolloidale Teilchen. Posternak[3]) fand, worauf wir des Näheren noch zurückkommen, daß die Reihenfolge der fällenden Ionen für Eiweiß in saurer Lösung sich umkehrt gegenüber der von Hofmeister[4]) und mir[1, 5]) für die natürliche Eiweißlösung gefundenen. Mit Rücksicht auf den von mir experimentell erwiesenen Antagonismus der beiden Ionen eines Elektrolyten bei der Eiweißfällung wäre das Hardysche Gesetz dahin zu erweitern, daß das fällungshemmende Ion immer das gleiche elektrische Zeichen hat wie das gefällte Kolloid.

Somit würde man konsequenterweise die Ionen nach ihrem Einflusse auf die Eiweißerdalkalifällung folgendermaßen klassifizieren:

Fällungsbefördernde Anionen CNS, > J, > Br, > NO_3, > Cl, > $C_2H_3O_2$.
Fällungshemmende Kationen Mg, > NH_4, > K, > Na.

Nach dieser Ordnung bestände auch hier die Möglichkeit, Salze zu kombinieren, bei denen die fällungslösende Wirkung der Kationen die fällende der Anionen übertrifft und zwar wären solche zu er-

*) Die doppelte elektrische Ladung derselben genügt nicht zur Erklärung ihres Verhaltens gegen Eiweiß. Das gleichfalls doppelt geladene Magnesium verhält sich ähnlich den Alkalien, das einfach geladene Li steht in mancher Hinsicht den Erdalkalien nahe. Sein Bromid hat fällende Eigenschaften und die erzeugten Fällungen werden rasch irreversibel.

warten beim Zusammenwirken der Endglieder der obigen Anionenreihe mit den Anfangsgliedern der unteren Kationenreihe, der schwächstfällenden mit den stärksthemmenden Ionen. Der Versuch hat diese Voraussetzung im wesentlichen bestätigt. Da die hohe Fällungsgrenze der meisten übrigen Kalziumverbindungen der Untersuchung von Salzkombinationen wegen unzureichender Löslichkeit Schwierigkeiten entgegensetzt, wurde vorwiegend die Beeinflussung des schon in einfacher Normallösung fällenden Kalziumrhodanides durch verschiedene Elektrolyte untersucht.

Faßt man zunächst die Versuche mit Kalziumrhodanid ins Auge, so lehrt die Tabelle VIII, daß in der Tat Nitrate, Chloride und Azetate Hemmungswirkungen entfalten, die — von dem anomalen Verhalten des Magnesiumazetates abgesehen — vom Natrium zum Ammonium und Magnesium an Intensität zunehmen.

Während also in bezug auf das Vorkommen antagonistischer Ionenwirkungen zwischen Alkali- und Erdalkalifällungen eine Übereinstimmung besteht, zeigen sich doch bei näherer Betrachtung neben der Änderung in der Ordnung der Ionen nicht unbedeutende Verschiedenheiten. Bei den Neutralsalzen der Alkalimetalle liegen die Verhältnisse einfacher wegen der relativen Konstanz der Ioneneigenschaften gegenüber den Eiweißfällungen durch verschiedene Elektrolyte. Sind etwa viererlei Ionen in einer Eiweißlösung, so können dieselben paarweise durch andere substituiert werden, ohne daß die übrig bleibenden eine nennenswerte Änderung in ihrem Fällungs- bzw. Hemmungswerte für Eiweißniederschläge erfahren. Ist einmal die Natur eines Salzes als lösend oder fällend gegenüber irgend einer reversiblen Eiweißfällung bestimmt, so läßt sich diese Eigenschaft gegenüber der Eiweißfällung durch irgend ein anderes Alkalisalz mit nur geringen Schwankungen des Grades gleichfalls wiederfinden.

Anders ist das Verhalten der irreversiblen Erdalkalieiweißfällungen, bei welchen der Effekt des zugesetzten Alkalisalzes oder seiner Ionen von dem fällenden Erdalkalisalze mitbestimmt wird. Schon der Vergleich mit früheren Versuchen [Tabelle III und IVa] zeigt, daß bei der Chlorkalziumfällung (8,5 bis 8,8 n) Salze fällungssteigernd wirken, die bei der Kalziumrhodanidfällung (1,0 n) sich als hemmend erwiesen haben, wie die Chloride und Nitrate von Natrium, Ammonium und Magnesium. Geht man mit Kalziumchlorid noch näher an die Fällungsgrenze (9,0 bis 9,2) [Tabelle VIII, C, 4 bis 10], dann tritt die Abwesenheit jeder Hemmungswirkung der genannten Elektrolyte noch deutlicher hervor. Der Antagonismus der Ionenwirkungen zeigt sich hie-



VIII. Hemmungswirkungen auf die Kalziumfällung.

a) Salze	Zustandsänderung sofort	Zustandsänderung nach 24h	b) Salze	Zustandsänderung sofort	Zustandsänderung nach 24h	c) Salze	Zustandsänderung sofort	Zustandsänderung nach 24h
1. 1,0 $Ca(SCN)_2$	zarte graue Trübung	milchige Trübung	1. 1,0 $Ca(SCN)_2$ + 2,0 $NaC_2H_3O_2$	fast klar	klar einige Flöckchen	1. 1,5 $Ca(SCN)_2$ + 2,0 $NaNO_3$	milchig	milchig opak
2. 1,0 $Ca(SCN)_2$ + 1,0 $NaCl$	zarte graue Trübung	feinmilchige Trübung	2. 1,0 $Ca(SCN)_2$ + 2,0 $NH_4C_2H_3O_2$	fast klar	klar	2. 1,5 $Ca(SCN)_2$ + 2,0 NH_4NO_3	klar	fast klar
3. 1,0 $Ca(SCN)_2$ + 1,0 NH_4Cl	fast klar	fast klar	3. 1,0 $Ca(SCN)_2$ + 2,0 $Mg(C_2H_3O_2)_2$	fast klar	milchig	3. 1,5 $Ca(SCN)_2$ + 2,0 $Mg(NO_3)_2$	klar	klar
4. 1,0 $Ca(SCN)_2$ + 1,0 $MgCl_2$	fast klar	fast klar	4. 1,5 $Ca(SCN)_2$ + 2,0 $NaC_2H_3O_2$	milchig	milchig opak	4. 9,2 $CaCl_2$	zart bläulich	milchig opak
5. 1,0 $Ca(SCN)_2$ + 2,0 $NaCl$	graue Trübung	milchig opak	5. 1,5 $Ca(SCN)_2$ + 2,0 $NH_4C_2H_3O_2$	klar	milchig opak	5. 9,2 $CaCl_2$ + 1,0 $NaCl$	milchige Trübung	milchig opak
6. 1,0 $Ca(SCN)_2$ + 2,0 NH_4Cl	klar	klar	6. 1,5 $Ca(SCN)_2$ + 2,0 $Mg(C_2H_3O_2)_2$	klar	milchig opak	6. 9,2 $CaCl_2$ + 1,0 NH_4Cl	milchige Trübung	milchig opak
7. 1,0 $Ca(SCN)_2$ + 2,0 $MgCl_2$	klar	klar	7. 1,0 $Ca(SCN)_2$	zarte Trübung	milchig	7. 9,2 $CaCl_2$ + 1,0 $MgCl_2$	milchige Trübung	milchig opak
8. 1,5 $Ca(SCN)_2$	klar	milchig opak	8. 1,0 $Ca(SCN)_2$ + 2,0 $NaNO_3$	zarte graue Trübung	fast klar	8. 9,2 $CaCl_2$ + 1,0 $NaNO_3$	milchige Trübung	milchig opak
9. 1,5 $Ca(SCN)_2$ + 2,0 $NaCl$	milchig opak	milchig opak	9. 1,0 $Ca(SCN)_2$ + 2,0 NH_4NO_3	klar	fast klar	9. 9,2 $CaCl_2$ + 1,0 NH_4NO_3	feinmilchige Trübung	milchig opak
10. 1,5 $Ca(SCN)_2$ + 2,0 NH_4Cl	milchig	milchig	10. $Ca(SCN)_2$ + 2,0 $Mg(NO_3)_2$	klar	klar	10. 9,2 $CaCl_2$ + 1,0 $Mg(NO_3)_2$	feinmilchige Trübung	milchig opak
11. 1,5 $Ca(SCN)_2$ + 2,0 $MgCl_2$	fast klar	milchig durchscheinend						

Kalziumrhodanid und -chlorid in entsprechenden Volumteilen einer 2,0 bzw. 12,0 Normallösung, die übrigen Salze in Substanz, 2 ccm Eiweiß.

nur als Variation der Fällungsverstärkung je nach dem beteiligten Kation. Es überragt eben in allen Fällen die Wirkung des fällenden die des hemmenden Ions.

Die bei den Salzkombinationen gefundenen Tatsachen stimmen sämtlich ausreichend mit der oben aufgestellten Ionenreihe hinsichtlich der Fällung und Hemmung der Erdalkalieiweißabscheidungen durch zugefügte Elektrolyte. Nur der Grad dieser Wirkungen wird durch das gewählte Salz der alkalischen Erde mitbestimmt. Er könnte sowohl von der Zahl der Erdalkaliionen als auch von der Natur und Zahl der dieselben begleitenden Anionen abhängen. Steigert man nämlich die Konzentration der fällenden Kalziumrhodanidlösung (auf 1,5 n, Tabelle VIII), so zeigen sich analoge Verhältnisse, wie bei der hochkonzentrierten Kalziumchloridlösung. Die zugesetzten Chloride, Azetate und Nitrate verlieren mehr oder minder ihr Hemmungsvermögen, das sie für 1,0 n Kalziumrhodanid besitzen und können selbst fällungsvermehrende Eigenschaften gewinnen. Dieser Umschlag der Wirkungen betrifft nicht alle Salze in gleichmäßiger Weise. Er ist auffallender bei Chloriden und Azetaten, von den Nitraten zeigt ihn jedoch nur das Natriumsalz.

Man könnte den Einfluß der Erdalkaliionen und der sie begleitenden Anionen auf die Wirkung zugesetzter Alkalisalze etwa folgendermaßen ausdrücken. „Je höher das mit dem Erdalkali eingeführte Anion in der Reihe der fällenden Anionen liegt, desto schwächer wirken die in der Ordnung tieferstehenden Anionen der zugesetzten Elektrolyte fällungsvermehrend, und die hemmende Wirkung der Alkaliionen kann neben der relativ geringen Zahl der Erdalkaliionen stärker hervortreten. [Beispiel das Verhalten bei 1,0 n-$Ca(SCN)_2$.] Und umgekehrt liegen die Dinge, wenn das das Erdalkali begleitende Anion einen niedrigen Fällungseffekt besitzt und die Zahl der mitwirkenden Erdalkaliionen eine große ist, z. B. bei 9,0 $CaCl_2$."

Möglicherweise tritt die Bedeutung der Anionen gegenüber der Zahl der Kalziumionen stark zurück. In diesem Sinne sprechen die Versuche mit Kalziumrhodanid, bei welchen die einfache Vermehrung der Konzentration von 1,0 auf 1,5 ohne Änderung des Anions hemmende Elektrolyte in fällungsbefördernde verwandelt*). Die das Erdalkali begleitenden Anionen könnten vielleicht nur eine indirekte Einwirkung auf die Eigenschaften

*) Bei einem bestimmten Gehalte an Kalziumrhodanid und Alkalisalz wird somit keine erkennbare Wechselwirkung eintreten.

zugesetzter Elektrolyte entfalten, indem sie die Zahl der zur Fällung notwendigen Kalziumionen mitbestimmen.

Eine schärfere Vorstellung von der Ursache der wechselseitigen Abhängigkeit der Erdalkali- und anderer Ionenwirkungen zu gewinnen, war einstweilen nicht möglich, es mußte genügen, einige immerhin schwierige tatsächliche Beziehungen festzustellen. Bei der gegenseitigen Beeinflussung der Alkalisalze sind die Gesetzmäßigkeiten einfacher, was nicht befremden kann, da es sich um die Kombination gleichartig wirkender Ionen handelt gegenüber der verschiedenen Veränderung der Proteinstoffe durch Alkaliionen einerseits und Erdalkaliionen andererseits.

Bei näherer Prüfung hatte es sich herausgestellt, daß das Zusammenbringen von nativer Eiweißlösung mit Erdalkalisalzen von einer Reaktionsänderung begleitet ist und so mußte zur Klarlegung des Anteiles einer solchen bei der Erdalkalifällung auch eine Untersuchung des Einflusses der Reaktionsänderung auf die Ioneneigenschaften gegenüber den Eiweißkörpern angeschlossen werden.

B. Einfluß der Reaktion auf das Verhalten der Elektrolyte gegen Eiweiß.

Durch einen einfachen Versuch kann man sich überzeugen, daß der Zusatz eines Erdalkalisalzes zu nativem Eierklar mit einer deutlichen Säuerung der Mischung einhergeht.

Man bereitet in einer Reihe von Eprouvetten Lösungen von 1,0 n-$CaCl_2$, $BaCl_2$, $SrCl_2$, $Ca(SCN)_2$ in 8 ccm Wasser und der Kontrolle halber in der gleichen Wassermenge fällende Neutralsalze der Alkalien, wie z. B. 3,0 n-$(NH_4)_2SO_4$, $NaC_2H_3O_2$, versetzt alle Eprouvetten mit einigen Tropfen n/10-NaOH oder 10 Proz. Na_2CO_3-Lösung und mit Phenolphtalein, welches infolge der starken alkalischen Reaktion gerötet wird. Beim Zusatze von je 2 ccm Eierklar werden sämtliche Lösungen, welche Erdalkalien enthalten, entfärbt, die übrigen bleiben unverändert.

Über die Reaktionsverhältnisse nativer Eiweißlösung haben uns in neuerer Zeit besonders die Arbeiten von Spiro und Pemsel[6]) und von Friedenthal[7]) wertvolle Aufklärungen gebracht.

Nach dem Gehalte an freien H- bzw. OH-Ionen beurteilt, müssen seit den Arbeiten Friedenthals die nativen Eiweißlösungen als fast neutral und nicht wie bis dahin als alkalische Flüssigkeiten angesprochen werden. Die durch Erdalkalisalze bewirkte Reaktionsänderung könnte in zweifacher Weise zustande kommen, durch eine Einwirkung auf die Salze oder auf die Eiweißkörper des Eierklars.

Da es sich bei den natürlichen Eiweißlösungen stets um Salzgemische handelt, so ist das Bestehen der neutralen Reaktion durch die annähernd vollständige Paralysierung der bei der Salzhydrolyse entstehenden $\overset{+}{H}$- und $O\bar{H}$-Ionen zu erklären. Es kann nun in solchen Salzgemischen der Zusatz eines für sich neutralen Salzes dieses Gleichgewicht der hydrolytischen Produkte stören und dadurch die Reaktion ändern. Das geschieht zweifellos durch Hinzufügen von Erdalkalien zu den Salzen des Eierklars, unter welchen die Karbonate und Phosphate von großem Einflusse auf die Reaktion sind. In Alkaliverbindungen zerfallen diese hydrolytisch in das stark dissoziierte NaOH, KOH und in die schwach dissoziierende Kohlensäure und Phosphorsäure. Sie werden also einen Überschuß von freien OH-Ionen liefern, der bei neutraler Reaktion durch anderweitige freie H-Ionen (oder die Eiweißkörper) gebunden sein muß. Tritt an Stelle von Na oder K das Erdalkali, so werden Salzkombinationen entstehen, welche die schwach dissoziierenden Basen $Ca(OH)_2$, $Ba(OH)_2$, $Sr(OH)_2$ hydrolytisch abspalten und die Zahl der freien OH-Ionen wird im Verhältnis zu der der H-Ionen verringert kenntlich an dem Farbenumschlag des Phenolphtaleins. Dieser Reaktionswechsel tritt auch ein, wenn die gebildete Erdalkaliverbindung in Lösung gehalten, beziehungsweise ihre feste Abscheidung verzögert wird*). Daß dieser Umsetzung von Alkalisalzen schwacher Säuren in Erdalkalisalze ein Anteil an der sie begleitenden Säuerung zukommen muß, geht daraus hervor, daß der Umschlag einer alkalischen Natriumkarbonatlösung in neutrale beziehungsweise sauere Reaktion (gegen Phenolphtalein) mit Hilfe Zusatzes von neutralem Kalziumchlorid auch bei Abwesenheit von Eiweiß erzielt werden kann.

Neben dieser auf Änderung der Salzhydrolyse beruhenden Reaktionsumkehr könnten auch die Wechselwirkungen der Eiweißkörper und Erdalkalien zu einer Säuerung führen. Es ist wohl allgemein angenommen, daß die Eiweißstoffe mit Erd- und Schwermetallen Salze bilden, ohne daß jedoch die Verhältnisse namentlich in physiko-chemischer Richtung genügend aufgeklärt wären. Die Bindungsfähigkeit von Proteinstoffen für Säuren und Laugen ist mit Hilfe von Indikatoren (F. Kraus, Spiro und Pemsel, Friedenthal) und mit Hilfe spezieller physikalisch-chemischer Methoden [Sjöquvist[8]), Bugarszky und Liebermann[9])] studiert worden und ihr eigenartiges amphoteres Ver-

*) Auf den Alkaliverlust der Salzmischung im Blute durch dessen Kalzium- und Magnesiumgehalt haben schon Spiro und Pemsel unter Anführung einiger schematischer Reaktionsgleichungen hingewiesen.

halten von Cohnheim und Krieger[16]) auf ihren Charakter als Pseudosäuren und -basen im Sinne von Hantzsch bezogen worden. Es fehlt jedoch ein verläßlicher Aufschluß darüber, ob die Eiweißkörper als „Zwitterionen“ das Schwermetall und das Anion gleichzeitig und in äquivalenten Verhältnissen an verschiedenen Stellen anlagern oder ähnlich dem Verhalten der Aminosäuren gegen Säuren und Alkohol die hydrolytischen Spaltungsprodukte der Salze (z. B. von $CaCl_2$ gleichzeitig $Ca(OH)_2$ und $2HCl$) binden, oder schließlich gegen Schwermetallsalze als echte Säuren reagieren. Nach dieser Ansicht, die am meisten Anhänger zu besitzen scheint*), wäre infolge Abtausches der schwer dissoziierenden Eiweißsäure gegen die leichter $\overset{+}{H}$-Ionen abspaltende des Schwermetallsalzes ein Reaktionsumschlag zu erwarten. Versuche, die zur Entscheidung dieser Fragen mit salzfreiem Eiweiß unternommen wurden, haben einstweilen noch kein einwandfreies Ergebnis gehabt.

Jedenfalls steht die Tatsache der Säuerung des nativen Eiweißes durch Erdalkalizusatz fest, unabhängig von der Frage nach dem Anteile der Salze und der Eiweißstoffe an dem Zustandekommen derselben. Nach den oben erwähnten Versuchen von Hardy und Posternak ergibt sich die Notwendigkeit, zu prüfen, ob in der Säuerung die Ursache für die gefundene Umkehr der Ionenwirkung bei Erdalkalifällung gegeben ist. Es wäre jedoch auch der Fall möglich, daß die die Erdalkalifällung begleitende Säuerung nur von nebensächlicher Bedeutung ist, und daß die Übereinstimmung der Ionenordnung bei Einwirkung von Wasserstoff- und Erdalkaliionen in beiden Fällen in der festen Verknüpfung elektropositiver Ionen mit dem Eiweiß begründet ist, gleichgiltig, ob dieselbe zur Bildung eines Azidalbumines oder Metallalbuminates führt. Um diese Frage einer Entscheidung zuzuführen, wurde das Verhalten der Ionen von Alkali- und Erdmetallsalzen bei verschiedener Reaktion untersucht.

Versuche.

Bei den folgenden Versuchen wurden die Reaktionsänderungen durch Zusatz entsprechender Mengen $^{n}/_{10}$-Salzsäure beziehungsweise $^{n}/_{10}$-Natronlauge bewirkt. In den Tabellen ist der auf die fertige Salzeiweißmischung bezogene Säure- oder Laugengehalt angeführt. Mehr als 0,03 n-Salzsäure kam nicht zur Verwendung, weil darüber hinaus, unbeeinflußt durch andere Elektrolyte, zu starke Säurefällung eintrat. Das nach Herstellung der Lösung zu-

*) Vgl. die Darstellung in Cohnheim, Chemie der Eiweißkörper S. 23.

gesetzte Eiweiß darf nicht über derselben geschichtet, sondern muß während des Eintragens eingerührt werden, um Veränderungen bei höherer Konzentration der Elektrolyte zu verhüten. Schon ein Gehalt von 0,01 n-HCl genügt, um starke Säurereaktion gegen Lackmuspapier zu erzeugen. Untersucht wurde zunächst der Einfluß der Reaktionsänderung auf die Wirkung natives Eiweiß fällender und lösender Elektrolyte und auf die zwischen denselben bestehende antagonistische Wechselbeziehung.

IX. Fällende Elektrolyte mit 0,01 n-HCl.

a) Salze	Zustandsänderung sofort	Zustandsänderung nach 24h	b) Salze + 0,01 n-HCl	Zustandsänderung sofort	Zustandsänderung nach 24h
1. 2,5 Na_2SO_4	milchige Trübung	flockiger Niederschlag	1. 2,5 Na_2SO_4	milchige Trübung	flockiger Niederschlag
2. 3,0 $(NH_4)_2SO_4$	fein-milchig	milchig	2. 3,0 $(NH_4)_2SO_4$	fein-milchig	milchig
3. 3,0 $MgSO_4$	fein-milchig	fein-milchig	3. 3,0 $MgSO_4$	fein-milchig	fein-milchig
4. 2,0 $K_2C_4H_4O_2$	fein-milchige Trübung	fein-milchig	4. 2,0 $K_2C_4H_4O_2$	fein-milchige Trübung	fein-milchig
5. 1,5 $K_3C_6H_5O_7$	fast klar	zarte Trübung	5. 1,5 $K_3C_6H_5O_7$	fast klar	zarte Trübung
6. 1,0 NaFl	sehr zarte Trübung	sehr zarte Trübung	6. 1,0 NaFl	sehr zarte Trübung	sehr zarte Trübung
7. 2,0 NH_4Fl	fein-milchige Trübung	fein-milchig	7. 2,0 NH_4Fl	fein-milchige Trübung	fein-milchig
8. 3,0 $NaC_2H_3O_2$	zarte Trübung	fein-milchig	8. 3,0 $NaC_2H_3O_2$	zarte Trübung	fein-milchig
9. 3,5 NaCl	sehr zarte Trübung	zarte Trübung	9. 3,5 NaCl	sehr zarte Trübung	zarte Trübung
10. 3,5 KCl	zarte Trübung	zarte Trübung	10. 3,5 KCl	zarte Trübung	zarte Trübung

Alle Salze in Substanz, 8 ccm Wasser, 2 ccm natives Eierklar.

Die Fällungsgrenze der untersuchten ein-, zwei- und dreibasischen Neutralsalze der Alkalimetalle wird durch 0,01 n-HCl nicht merklich beeinflußt.



X. Sulfate von Na, K, NH_4 und Mg bei verschiedener Reaktion.

Salze	Zustandsänderung bei nativer Reaktion		Zustandsänderung bei 0,02 n HCl		Zustandsänderung bei 0,02 n-NaOH	
	sofort	nach 24^h	sofort	nach 24^h	sofort	nach 24^h
1. 2,5 Na_2SO_4	flock. N. in klarer Flüssigkeit	flockiger Niederschl.	milchig	flockiger Niederschl.	milchig durchscheinend	flockiger Niederschl.
2. 2,5 K_2SO_4	zarte Trübung	zarte Trübung Salz z. T. ungelöst	zarte Trübung	zarte Trübung Salz z. T. ungelöst	sehr zarte Trübung Salz z. T.	sehr zarte Trübung ungelöst
3. 2,5 $(NH_4)_2SO_4$	zarte Trübung	fein-milchig	fein-milchig	fein-milchig	fein-milchig	fein-milchig
4. 2,5 $MgSO_4$	zarte Trübung weniger dicht als 3	fein-milchig	zarte Trübung	fein-milchig	zarte Trübung	fein-milchig

Salze in Substanz, 8 ccm Wasser, 2 ccm natives Eiweiß.

Bei 0,02 n-HCl wird die Fällung durch die Sulfate des Na, K, NH_4 und Mg gegenüber der Fällung bei nativer Reaktion etwas beschleunigt, bei 0,02 n-NaOH etwas verzögert. Nach 24 Stunden sind die Unterschiede der Fällungen ausgeglichen. Alle Niederschläge, selbst die grobflockigen, bleiben reversibel.

XI. Nicht fällende Elektrolyte bei 0,01 n-HCl in sechsfacher Normallösung.

Kationen → / Anionen ↓	Mg		NH_4		K		Na	
	Zustandsänderung		Zustandsänderung		Zustandsänderung		Zustandsänderung	
	sofort	nach 24^h	sofort	nach 24^h	sofort	nach 24^h	sofort	nach 24^h
$C_2H_3O_2$	klar? Salz z. T.	trüb? unlöslich	sehr zarte Trübung	zarte Trübung	—	—	—	—
Cl	klar	klar	klar	klar	—	—	—	—
NO_3	klar	klar	klar	klar	klar	klar	—	—
Br	klar	klar	klar	klar	klar	klar	klar z.T. auskristallisiert	klar
J	—	—	klar	milchige Trübung	zarte Trübung	fein-milchig	—	—
CNS	milchige Fällung	milchig mit flock. Niederschlag	fein-milchige Trübung	milchige Trübung	zarte Trübung	fein-milchig	fast klar	zarte Trübung

Alle Salze in Substanz, 8 ccm Flüssigkeit, 2 ccm natives Eierklar.

Bei schwacher Ansäuerung (0,01 n-HCl) und sechsfacher Normalkonzentration werden von sonst nicht fällenden Elektrolyten nur die Rhodanide und Jodide zu Fällungsmitteln, nach Kationen abfallend geordnet in der Reihe Mg, NH_4, K, Na. Die Fällungen sind irreversibel.

XII. Ammoniums

Salze	Zustandsänderung bei 0,01 n-HCl	
	sofort	nach 24
6,0 $NH_4C_2H_3O_2$	sehr zarte Trübung	zarte Trübu
6,0 NH_4Cl	klar	kl
6,0 NH_4NO_3	klar	
6,0 NH_4Br	klar	
6,0 NH_4J	klar	
6,0 NH_4CyS	fein-milch	

Salze

Bei zı
Chloride, N
salze erst
irreversil

XIII. S

I.
sofo
24

XIV. Salze von Na, K, NH_4 und Mg in 0,5 Normalkonzentration bei 0,03 n-HCl.

I.	Na_2SO_4	K_2SO_4	$(NH_4)_2SO_4$	$MgSO_4$
sofort	zarte ringförmige Trübung bei Schichtung			
	sehr zarte Trübung	sehr zarte Trübung	opaleszent	opaleszent
15h	milchige Trübung	milchige Trübung	milchige Trübung	feinmilchig
II.	NaCl	KCl	NH_4Cl	$MgCl_2$
sofort	zarte Trübung	sehr zarte Trübung	sehr zarte Trübung	sehr zarte Trübung
24h	milchige opake Trübung			
III.	$NaNO_3$	KNO_3	NH_4NO_3	$Mg(NO_3)_2$
sofort	dickmilchige Fällung			
15h	milchige Trübung, z. T. abgesetzter Niederschlag			
IV.	NaBr	KBr	NH_4Br	$MgBr_2$
sofort	milchige zart-flockige Trübung	dichte feinmilchige Trübung	feinmilchige Trübung	zarte Trübung
15h	dickmilchige Fällung			
V.	NaCyS	KCyS	NH_4CyS	$Mg(CyS)_2$
sofort	überall dickmilchiger Niederschlag			
15h	dickmilchiger Niederschlag, z. T. sich absetzend			

Versuchsbedingungen sonst wie bei XIII.

XV. Salze von Na, K, NH_4 und Mg in 1,0 Normalkonzentration bei 0,03 n-HCl.

I.	NaCl	KCl	NH_4Cl	$MgCl_2$
sofort	fast klar	sehr zarte Trübung	sehr zarte Trübung	sehr zarte Trübung
24h	fast klar	sehr zarte Trübung	dickmilchig	dickmilchig
II.	NaBr	KBr	NH_4Br	$MgBr_2$
sofort	milchig	milchig	milchig	Ringbildung beim Schichten, fast klar
24h	dickmilchig	dickmilchig	dickmilchig	fast klar
III.	KNO_3		$Mg(NO_3)_2$	$Mg(CyS)_2$
sofort	feinmilchig		dickmilchig	sehr zarte Trübung
24h	dickmilchig		dickmilchig	milchig opak (irreversibel bei Verdünnung)

Versuchsbedingungen wie bei XIII.

XVI. Wechselwirkung fällender und nichtfällender Elektrolyte.

Salze	1. 2,5 $(NH_4)_2SO_4$	2. 2,5 $(NH_4)_2SO_4$ + 1,5 NH_4CyS	3. 2,5 $(NH_4)_2SO_4$ + 1,5 NH_4CyS + 0,01 HCl	4. 1,0 $(NH_4)_2SO_4$ + 0,03 HCl	5. 1,0 NH_4CyS + 0,03 HCl	6. 1,0 $(NH_4)_2SO_4$ + 1,0 NH_4CyS + 0,03 HCl
Zustandsänderung sofort	sehr zarte Trübung	klar	milchige Fällung	feinmilchig	milchig opak	milchig opak
Zustandsänderung nach 24h	feinmilchig	klar	dickmilchig	milchig	grobflockig z. T. abgesetzt	grobflockig z. T. abgesetzt

Salze	7. 0,03 HCl + 1,0 NH_4CyS	8. 0,03 HCl + 1,0 NH_4CyS + 2,0 $NaC_2H_3O_2$	9. 0,03 HCl + 1,0 NH_4CyS + 2,0 $NH_4C_2H_3O_2$	10. 0,03 HCl + 1,0 NH_4CyS + 2,0 $Mg(C_2H_3O_2)_2$	11. 0,03 HCl + 1,0 NH_4CyS + 2,0 $NaNO_3$	12. 0,03 HCl + 1,0 NH_4CyS + 2,0 KNO_3
Zustandsänderung sofort	milchig opak	klar	klar	klar	milchig opak	milchig opak
Zustandsänderung nach 24h	flockig, abgesetzt	klar	klar	klar	milchig opak	milchig opak

Salze	13. 0,03 HCl + 1,0 NH_4CyS + 2,0 NH_4NO_3	14. 0,03 HCl + 1,0 NH_4CyS + 2,0 $Mg(NO_3)_2$	15. 0,03 HCl + 1,0 NH_4CyS + 1,0 K_2SO_4	16. 0,03 HCl + 1,0 NH_4CyS + 1,0 $(NH_4)_2SO_4$	17. 0,03 HCl + 1,0 NH_4CyS + 1,0 $MgSO_4$	18. 0,03 HCl + 1,0 NH_4CyS + 1,0 NH_4J
Zustandsänderung sofort	milchig opak	milchig opak	milchig opak	milchig opak	milchig opak	fast klar
Zustandsänderung nach 24h	milchig opak	milchig opak	milchig opak	milchig opak	milchig opak	fast klar

Salze	19. 0,03 HCl + 1,0 NH_4CyS + 1,0 $K_2C_4H_4O_6$	20. 0,03 HCl + 1,0 NH_4CyS + 1,0 $K_3C_6H_5O_7$	21. 0,02 HCl + 2,0 NH_4CyS	22. 0,02 HCl + 2,0 NH_4CyS + 2,0 $NaNO_3$	23. 0,02 HCl + 2,0 NH_4CyS + 2,0 KNO_3	24. 0,02 HCl + 2,0 NH_4CyS + 2,0 NH_4NO_3	25. 0,02 HCl + 2,0 NH_4CyS + 2,0 $Mg(NO_3)_2$
Zustandsänderung sofort	klar	klar	zarte Trübung; nach 6h milchig opak	klar; klar	feinmilchig	feinmilchige Trübung	fast klar; feinmilchig
					milchig durchscheinend		
Zustandsänderung nach 24h	klar	feinmilchig	milchig opak	zarte Trübung	milchig durchscheinend	milchig opak	milchig opak

In der ersten Horizontalreihe $(NH_4)_2SO_4$ in Volumteilen einer 5 n-Lösung, in den übrigen Versuchen 5 ccm einer 2 n-Lösung von NH_4CyS, die übrigen Salze in Substanz. Überall 2 ccm natives Eiweiß, Gesamtflüssigkeit 10 ccm.

Diese Versuchstabellen illustrieren den Einfluß zunehmender Salzkonzentration auf die Fällung bei 0,03 n-HCl-Gehalt. Die Resultate sind einheitlich, wenn man von den Chloriden absieht, die einige Abweichungen zeigen. Nach Anionen geordnet wächst das Fällungsvermögen in der Ordnung SO_4, NO_3, Br, CNS, nach Kationen nimmt es ab in der Reihenfolge Na, K, NH_4, Mg.

Die im allgemeinen schwächere Wirkung der Chloride beruht wohl auf der Dissoziationsverminderung der gemeinionigen Chlorwasserstoffsäure. Bei niederem Chloridgehalt (0,25, 0,5 n) ordnen sich auch hier die Kationen in der Reihenfolge Na, K, NH_4, Mg nach Abnahme ihrer Wirkung. Bei höherem Salzgehalte (1,0 n) kehrt sich die Reihenfolge der Kationen um und wird dieselbe wie in Versuch IX bei geringem Säuregehalt (0,01 n-HCl). Es liegt nahe, dieses Verhalten auf die stärkere Dissoziationsverminderung der Salzsäure durch die zugesetzten Chloride zu beziehen.

Bei 0,03 n-HCl geht die Fällung für wachsende Konzentrationen der zugesetzten Elektrolyte durch ein Maximum, um dann mit zunehmendem Salzgehalte zu sinken. Die Maxima liegen für äquivalente Salzlösungen nicht strenge bei der gleichen Konzentration. Sämtliche Fällungen sind bei Verdünnung irreversibel.

Es gelingt auch für die Fällung durch Alkalisalze bei Säuerung antagonistische, die Fällung hemmende Ionenkombinationen zu finden. Eine solche Hemmung zeigen Azetate, Fluoride, Tartrat und Citrat. Bei den Sulfaten ist diese Erscheinung nicht nachweislich. (Tabelle XVI.)

Zusammenfassung der Ergebnisse bei Reaktionsänderung.

Bei Anwesenheit freier Wasserstoffionen kommen abhängig von der Konzentration der letzteren unter dem gleichzeitigen Einflusse von Alkalisalzen zweierlei Zustandsänderungen von Eiweiß vor, die strenge auseinandergehalten werden müssen.

Ein Gehalt von nur 0,01 n- und selbst 0,02 n-Salzsäure ermöglicht sowohl reversible Fällungen durch die auch sonst fällenden Alkalisalze (Sulfate, Tartrate, Citrate, Azetate u. s. f.) als auch irreversible durch bei nativer Reaktion nicht fällende Elektrolyte. Eine Verschiebung der Fällungsgrenze der typischen proteinfällenden Leichtmetallsalze findet unter diesen Umständen nicht statt, nur eine geringfügige Beschleunigung des Vorganges wird merklich. (Tabelle IX und X.) Demgemäß wird bei den natives Eiweiß fällenden Elektrolyten die Ordnung der Ionen nach ihrem Wirkungswerte nicht geändert. Hingegen tritt schon bei diesem niedrigen Grade der Säuerung eine starke Beeinflussung

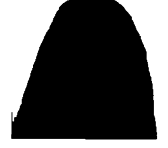
der Endglieder der bekannten Ionenreihe der Jodide und Rhodanide auf, indem diese nun mit Eiweiß irreversible Fällungen geben. (Tabelle XI.) Zugleich kehrt sich gegenüber dem Verhalten bei nativer Reaktion die Reihenfolge der Kationen um, da das Fällungsvermögen für dasselbe Anion (J, CNS) nach der Ordnung Mg, NH_4, K, Na abnimmt. Dieselbe Aufeinanderfolge der Kationen gilt auch für höheren Chlorwasserstoffgehalt (0,03 n) bei den Chloriden, sobald dieselben als gemeinionige Elektrolyte die Zahl der freien H-Ionen verringern. (Tabelle XV.)

Bei genügender Zahl freier Wasserstoffionen (0,03 n-HCl mit verschiedenionigen Elektrolyten) treten nur irreversible Eiweißfällungen auf. Die Fähigkeit, zu solchen zu führen, bleibt nicht auf Jodide und Rhodanide beschränkt, sondern geht auch auf Bromide, Nitrate und Chloride über. (Tabelle XII.) Es gilt für die Anionen nach zunehmender Fällung die Reihe SO_4, Cl, Br, NO_3, J, SCN und für das gleiche Anion und verschiedene Kationen wächst das Fällungsvermögen eines Salzes in der Reihe Mg, NH_4, K, Na.

Die Fällungswirkung eines Elektrolyten bei Anwesenheit zahlreicher freier H-Ionen ändert sich abhängig von seiner Konzentration in verschiedenem Ausmaße. Im allgemeinen passiert dieselbe bei zunehmender Konzentration ein Maximum, um hierauf zu sinken. (Vgl. Tabelle XIII, XIV, XV.) Die Form dieser Kurve ist bei den einzelnen Salzen von Anion und Kation abhängig. So ändern die Rhodanide selbst bei einer Konzentrationsschwankung um das Vierfache (0,25 bis 1,0 n) ihre Wirkung nur wenig bis auf eine geringe Abschwächung beim Magnesiumrhodanid. Die Bromide zeigen ein Maximum bei (0,5 bis 1,0 n), um dann in ihrem Fällungseffekte abzunehmen (vgl. das Magnesiumbromid). Die Nitrate verhalten sich ähnlich den Rhodaniden. Bei den Chloriden zeigt sich das oben erörterte anomale Verhalten infolge der gleichzeitigen Dissoziationsänderung der Chlorwasserstoffsäure. Natrium- und Kaliumchlorid gehen bei 0,5 n durch ein Maximum, für das Ammonium- und Magnesiumsalz liegt dasselbe höher.

Eine ähnliche Maximumbildung bei steigender Konzentration des zugesetzten Elektrolyten wurde in einer früheren Untersuchung der Eiweißkoagulation durch Hitze, gleichfalls einer irreversiblen Zustandsänderung, aufgefunden[5]).

Auch für die Wirkung auf die Eiweißfällung bei Gegenwart von freier Säure lassen sich antagonistische Elektrolyte finden. So hemmen sämtliche Azetate, Citrat, Tartrat und Fluorid die fällende Wirkung des Rhodanammoniums bei Anwesenheit von



0,03 n-Salzsäure. Den Sulfaten kommt diese Gegenwirkung weder bei schwachem noch bei starkem Säuregehalt zu.

Nach den herrschenden Anschauungen*) besteht auf Grund der erwähnten Versuche von Posternak und Hardy die Neigung, die Eiweißfällung bei saurer Reaktion als eine einfache Umkehr der Erscheinung bei alkalischer bzw. nativer Reaktion anzusehen. Die Verhältnisse sind in Wirklichkeit nicht so einfach, es handelt sich um zwei verschiedene Erscheinungsreihen. Bei nativer Reaktion tritt eine reversible Zustandsänderung ein, bei stark saurer eine irreversible. Das Gefällte ist im zweiten Falle eine feste Verbindung des Eiweißes mit H-Ionen. Das Auftreten dieser Verbindung ist sowohl von der Konzentration der freien Wasserstoffionen als auch von der Natur der übrigen anwesenden Ionen abhängig. Bei geringem Gehalte an Wasserstoffionen bilden die geläufigen fällenden Alkalisalze noch reversible Eiweißniederschläge, die also innerhalb gewisser Grenzen unabhängig von der bestehenden Reaktion auftreten. Dagegen ist schon bei geringem Säuregrad (0,01 n·HCl) das Hemmungsvermögen der natives Eiweiß lösenden Salze vernichtet und an Stelle desselben haben diese proteinfällende Eigenschaften gewonnen. So ist bei 0,01 n·HCl weder Ammoniumsulfat ein Hemmungsmittel für die irreversible Ammoniumrhodanidfällung noch das Rhodanid, wie bei nativer Reaktion, ein Antagonist der reversiblen Sulfatfällung. (Tabelle XVI.) Erst bei 0,03 n·HCl gewinnen sonst fällungsbegünstigende Salze ein mehr oder minder bedeutendes Hemmungsvermögen für beispielsweise durch Rhodanammonium erzeugte irreversible Niederschläge. Um eine einfache Umkehr der Ionenwirkung bei Änderung der Reaktion handelt es sich deshalb nicht, weil nicht der Eintritt einer selbst stark sauren Reaktion maßgebend ist, sondern der Gehalt an freien Wasserstoffionen die Fähigkeit eines Salzes, Eiweiß zu fällen oder zu lösen, bestimmt. So wirken die Nitrate bei 0,03 n·HCl als Fällungsverstärker, bei 0,02 n·HCl als fällungshemmende Verbindungen. (Tabelle XVI.)

Dieses Verhalten erinnert an das oben erörterte Hemmungsvermögen der Elektrolyte gegenüber den Kalziumeiweißfällungen, welches für dasselbe Salz (Nitrat) abhängig von der Zahl der in Aktion tretenden Kalziumionen positiv oder negativ werden kann. Überhaupt zeigen die Fällungs- und Hemmungserscheinungen bei Erdalkaliionen vielfache Übereinstimmung mit denen bei Anwesenheit freier Wasserstoffionen; nur für wenige Elektrolyte be-

*) Vgl. die klare Zusammenstellung bei Höber, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe, VIII. Kap., 1902.

stehen Unterschiede. Nach den Versuchen bei starkem und schwachem Säuregrad und hoher und niederer Erdalkalikonzentration ist aber nicht zu erwarten, daß die relativ geringe Säuerung bei Mischung von Erdalkalien mit Eiweiß die Ursache für die Änderung der Wirkung zugesetzter Ionen darstellt. In der Tat zeigt die folgende Tabelle sowohl bei schwach saurer als auch bei schwach alkalischer Reaktion das gleiche Endresultat der Kalziumwirkung. Nur am Anfange besteht ein kleiner Unterschied im Reaktionsverlauf, der bei freien Wasserstoffionen etwas beschleunigt wird.

XVII. $CaCl_2$ + NaSCN bei verschiedener Reaktion.

Salze	Zustandsänderung sofort	nach 36h	Salze	Zustandsänderung sofort	nach 36h
1. 1,0 $CaCl_2$	fast klar	fast klar	6. 1,0 $CaCl_2$ + 1,0 NaSCN	fast klar	dick-milchig
2. 1,0 $CaCl_2$ + 0,01 n-NaOH	zarte Trübung	zarte Trübung	7. 1,0 $CaCl_2$ + 0,01 n-HCl	fast klar	klar
3. 1,0 $CaCl_2$ + 0,02 n-NaOH	zarte Trübung	zarte Trübung	8. 1,0 $CaCl_2$ + 0,02 n-HCl	feine Trübung	fein-milchige Trübung
4. 1,0 $CaCl_2$ + 1,0 NaSCN + 0,01 n-NaOH	fein-milchige Trübung	milchig	9. 1,0 $CaCl_2$ + 1,0 NaSCN + 0,01 n-HCl	milchige Trübung	milchige Trübung
5. 1,0 $CaCl_2$ + 1,0 NaSCN + 0,02 n-NaOH	fein-milchige Trübung	dick-milchig	10. 1,0 $CaCl_2$ + 1,0 NaSCN + 0,02 n-HCl	dick-milchige Trübung	dick-milchige Trübung

Überall 2 ccm einer 5fach normalen $CaCl_2$-Lösung, NaSCN in Substanz, 2 ccm native Eiweißlösung auf 10 ccm Gesamtflüssigkeit. Auch die Proben 4 und 5 geben intensive Rötung mit Phenolphtalein.

Die Erdalkalifällung tritt nach diesen Versuchen auch bei alkalischer Reaktion ein, sie ist nicht an die Anwesenheit freier Wasserstoffionen geknüpft. Nicht diese, sondern der Eintritt eines elektropositiven Ions in festerer Bindung bedingt die gemeinsamen Züge in dem Verhalten der Erdalkalien und der Säurefällung.

* * *

In den hier mitgeteilten Versuchen wurden die Eigenschaften einer Klasse irreversibler Eiweißfällungen, die bei festerer Verknüpfung gewisser elektropositiver Ionen mit dem Protein entstehen, in einigen Punkten festgestellt. Durch die Identität der

Ionenordnung und den Nachweis antagonistischer Ionenwirkungen konnten die Erscheinungen mit den bei Neutralsalzen gemachten Wahrnehmungen in Zusammenhang gebracht und eine Reihe gesetzmäßiger Abweichungen auf die Abhängigkeit des Verhaltens dieser irreversiblen Eiweißfällungen von der Zahl der in Aktion tretenden Erdalkali- bzw. Wasserstoffionen zurückgeführt werden.

Es wäre, was in den bisherigen Mitteilungen aus guten Gründen vermieden wurde, sehr verlockend, auch vom Standpunkte der gegenwärtigen Theorien der Kolloidfällung die Versuchsergebnisse zu betrachten. Gerade das Studium der organischen Kolloide insbesondere von Leim und Eiweißkörpern, ist geeignet, den Forscher vor einer einseitigen Auffassung zu bewahren. Denn diese Körper bilden Objekte mit einer großen Mannigfaltigkeit physikalisch-chemischer Beziehungen, welche den von den Physiko-Chemikern meist benutzten anorganischen Kolloiden mehr oder minder abgehen. So zeigen die Eiweißkörper neben Förderung auch Verhinderung der Ausflockung durch Elektrolyte, neben Hemmungs- auch Fällungswirkungen durch Nichtelektrolyte. Kolloidale Metalllösungen sind hingegen für alle Elektrolyte empfindlich und andererseits sind anorganische Kolloide, wie das vielverwendete Arsensulfid, auch gegen proteinfällende Nichtelektrolyte wie Methyl-, Äthylalkohol, Formaldehyd, Phenol, Chloroform unempfindlich. So wurde seitens der Untersucher anorganischer Kolloide das auch theoretisch wichtige Vorkommen kolloidlösender Elektrolyte und kolloidfällender Nichtelektrolyte nicht genügend berücksichtigt. Dazu kommt noch die für das Verhältnis zu Elektrolyten wesentliche Eigenschaft der Eiweißkörper, nach der Gleichung $\mathrm{OH\,RH} \lessgtr \overset{+-}{\mathrm{R}} + \overset{-}{\mathrm{OH}} + \overset{+}{\mathrm{H}}$ als amphoterer Elektrolyt im Sinne Bredigs[1]) zu dissoziieren, und die Fähigkeit, mit verschiedenen Ionen Verbindungen von verschiedener Festigkeit und Löslichkeit einzugehen.

Vornehmlich die Begrenztheit des Objektes hat die Untersucher anorganischer Kolloide auf eine elektrische Theorie der Fällung hingeleitet, welche alle Unterschiede im Fällungsvermögen von Elektrolyten, soweit sie mit Verschiedenheiten der elektrischen Ladung zusammenfallen, erklären kann, einstweilen aber versagt, falls man etwa die Übereinstimmung der Wirkung des zweiwertigen Magnesiums mit den einwertigen Alkalimetallen, oder die großen Verschiedenheiten im Verhalten einwertiger Kationen je nach dem begleitenden (einwertigen) Anion ins Auge faßt, oder sobald man mit ihrer Hilfe die in manchen Fällen zu beobachtende Verstärkung der Ausflockung durch Zurückdrängen der Ionisation,

also Vermehrung der elektrisch neutralen Moleküle, oder den Fällungseffekt von Nichtelektrolyten erklären will.

Alle diese Fälle lassen sich zwanglos im Rahmen einer Anschauung unterbringen, die wohl schon lange von Hofmeister und Spiro[13]) vertreten worden ist, jedoch erst jüngst durch eine vortreffliche Untersuchung Spiros[13]) eine breitere Basis und schärfere Fassung erhalten hat. Er fand bei der Analyse von Kasein- und Leimniederschlägen durch Salze, daß es sich in allen diesen Fällen um Verteilung von Kolloid und Salz in der Lösung nach den auch für die Existenz anderer Entmischungen gültigen Regeln handelt, wobei die Lösungsintensitäten der Salze sich ähnlich wie andere Eigenschaften derselben additiv aus dem Wirkungsanteile der in ihrer Lösung vorhandenen Molekülgattungen zusammensetzen. Selbst bei Annahme einer Mitwirkung „elektrokapillarer“ Veränderungen im Sinne von Hardy und Bredig, den Vertretern der elektrischen Theorie, erscheint es nicht ausgeschlossen, daß diese in der allgemeineren Hofmeister-Spiroschen Theorie einer wechselseitigen Löslichkeitsbeeinflussung im Verteilungssystem Wasser-Salz-Kolloid aufgeht. Man kann unschwer Andeutungen eines vermittelnden Standpunktes in einer neueren Arbeit H. Freundlichs[14]) aus Ostwalds Institut wahrnehmen. Die Fällung wird hier durch einen zeitlich ablaufenden Vorgang (Ionendiffusion) erklärt und von dem Teilungskoeffizienten der Ionen zwischen den zwei Phasen (den festen Teilchen und der Flüssigkeit in der kolloidalen Suspension) abhängig gedacht. Zugleich wird das Mitwirken anderer Momente neben der elektrischen Ladung betont.

Indem wir uns eine eingehendere Betrachtung der hier mitgeteilten Ergebnisse nach Veröffentlichung der Versuche mit Schwermetallen und der Wechselbeziehungen zwischen Elektrolyten und Nichtelektrolyten vorbehalten, sei hier nur konstatiert, daß in den gefundenen Tatsachen ein Widerspruch gegen die Hofmeister-Spirosche Theorie der Kolloidfällung nicht enthalten ist.

Nach der biologischen Seite bieten die aufgefundenen Ionenbeziehungen einige wertvolle Anregungen. Die in der letzten Mitteilung berichteten Ionenwirkungen hatten eine andere Gruppierung der Ionen nach ihren pharmakologischen Eigenschaften veranlaßt[15]), die zur Aufdeckung einiger nicht gekannter arzneilicher Wirkungen des Rhodans führte, welche auch in (noch unveröffentlichten) tierexperimentellen Studien ihre Bestätigung fanden.

Von den Metallen der alkalischen Erden hat Kalzium das stärkste physiologische*), Baryum das bedeutendste toxikologische Interesse. Es liegt nun nahe, die physiologischen Wirkungen dieser Ionen mit anderen zu kombinieren, in der Art, wie dies bei der Einwirkung auf Proteinstoffe geschieht. Der amerikanische Physiologe J. Loeb[16]) hat tatsächlich in seinen geistvollen Untersuchungen über Ionenwirkungen bereits eine Reihe hierher gehöriger Phänomene aufgedeckt. Er fand bei Einwirkung von Salzen auf die Entwickelung von Seeigel- und Funduluseiern und auf rhythmische Kontraktionen einen Antagonismus zwischen dem zweiwertigen Ca, Ba, Sr und einwertigen Kationen, der eine bemerkenswerte Analogie mit der wechselseitigen Hemmung solcher Ionen bei den Zustandsänderungen der Eiweißstoffe darbietet.

Die Analyse der Erdalkaliwirkungen hat sich auch bei der Untersuchung der Schwermetalleiweißfällungen als aufklärend erwiesen, welche in experimenteller Hinsicht abgeschlossen ist und Gegenstand der folgenden Abhandlung werden soll.

Literaturverzeichnis.

1) Pauli, Diese Beiträge **3**, 225.
2) Hardy, Zeitschr. f. physik. Chemie **33**, 391 (1900).
3) Posternak, Annales de l'Institut Pasteur **15**, 85 (1901).
4) Hofmeister, Arch. f. experim. Path. u. Pharm. **25**, **27**, **28**.
5) Pauli, Pflügers Archiv **78**, 315.
6) Spiro und Pemsel, Zeitschr. f. physiol. Chemie **26**, 233.
7) Friedenthal, Zeitschr. f. allg. Physiologie **1**, 56 u. Verhandl. d. physiol. Ges. zu Berlin 1902 bis 1903, Nr. 10 bis 11.
8) Sjöqvist, Skandin. Arch. f. Physiologie **5**, **6**.
9) Bugarszky und Liebermann, Pflügers Archiv **72**, 51.
10) Cohnheim und Krieger, Zeitschr. f. Biologie 1900.
11) Bredig, Zeitschr. f. Elektrochemie **6**, 33.
12) Spiro, Über physik. u. physiol. Selektion, Straßburg.
13) Spiro, Diese Beiträge **4**, 300.
14) H. Freundlich, Zeitschr. f. physik. Chemie **49**, 129.
15) Pauli, Münch. med. Wochenschr. 1903, Nr. 4.
16) J. Loeb, Pflügers Archiv **88**, 68; **91**, 248; **93**, 246.
J. Loeb, American Journal of Physiology **6**, 411.

*) M. Pfaundler hat in einer inzwischen als vorläufige Mitteilung publizierten Untersuchung die Adsorptionsverhältnisse verschiedener Gewebe für Kalziumionen geprüft und diesen Vorgang der Kalziumadsorption sozusagen als den primitiven Prozeß der vitalen Kalkassimilation aufgefaßt und mit einer Theorie der Rhachitis in Zusammenhang gebracht. (Münch. med. Wochenschr. 1903, S. 1577.)

IV.

Zur Theorie der Säurebildung in der Magenschleimhaut.

Von Dr. **Leo Schwarz** (Prag).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Daß zwischen der Säurebildung im Magen und der Reaktion des Harns Beziehungen obwalten, ist bekanntlich, seit zuerst Bence Jones darauf aufmerksam gemacht hat, oft und eingehend untersucht worden. Danach fällt ziemlich regelmäßig lebhafte Magensaftbildung mit einer Abnahme der sauren Reaktion des Harns, bzw. einem Umschlag derselben in Alkaleszenz zusammen.

Als Ursache der Erscheinung wird allgemein angenommen, daß bei der Bildung des Magensaftes in den Drüsenelementen der Schleimhaut eine Zerlegung von aus dem Blut zugeführtem Chlornatrium in der Art erfolgt, daß einerseits Chlorwasserstoff, andererseits Natriumkarbonat entsteht, beide Produkte aber auf entgegengesetzten Wegen weiter befördert werden, die Salzsäure in das Magenlumen, das Natriumkarbonat zurück zum Blut und mit diesem zur Niere.

Minder sicher läßt sich diese Auffassung auf eine ähnliche von Falck und M. Gruber beobachtete Tatsache anwenden, nämlich daß reichliche Kochsalzzufuhr bei Hunden im Chlorhunger den Harn unabhängig von der Nahrungszufuhr stark alkalisch macht.

Da gerade dieser Ausnahmefall eine Erklärung über den Vorgang der Säurebildung im Magen zu versprechen schien, wurde er zum Ausgangspunkt der mitzuteilenden Versuche gewählt.

Zunächst noch einige Bemerkungen über die von Falck und Gruber gewählte Versuchsanordnung.

C. Ph. Falck*) brachte einer 11 kg schweren Hündin etwa 10 g Kochsalz in 5proz. Lösung mittels Schlundsonde, in anderen Versuchen die gleiche Menge intravenös bei und fand in den folgenden Stunden die Reaktion des Harns immer alkalisch. Der Harn brauste mit Säuren auf, er enthielt Natriumkarbonat („Sodaurin").

Max Gruber**) fand, daß der Wechsel der Harnreaktion nach Kochsalzeingabe nur nach vorgängigem Kochsalzmangel völlig regelmäßig eintrat. Er untersuchte die Abhängigkeit der Erscheinung in ihrer Stärke und Dauer von der Dosis des verabreichten Chlornatriums genauer. Aus seinen Beobachtungen im Zusammenhalt damit, daß am ersten Tage einer erhöhten Kochsalzzufuhr weniger Chlor im Harn erschien als zugeführt wurde, geht nach Gruber hervor, daß eine Zerlegung dieses Salzes verbunden mit Zurückhaltung (und späterer Abgabe) von Chlorwasserstoffsäure im Körper stattfindet. Da ihm nach den erwähnten älteren Untersuchungen über Zusammenhang der Harnalkaleszenz mit der Magensekretion die gleiche Deutung auch für diese Beobachtung berechtigt schien, so nahm er keinen Anstand, seine Beobachtungen so auszudrücken: „Die Menge der im Magen abgesonderten freien Salzsäure ist (innerhalb gewisser Grenzen) abhängig von der Größe der Kochsalzzufuhr."

Daß in diesen Versuchen nach der Kochsalzzufuhr eine reichlichere Säuresekretion Platz greift, geht allerdings, wie Maly betont***), aus Grubers Versuchen nicht hervor, und auch die Beobachtung Falcks, daß intravenöse Kochsalzeinfuhr im gleichen Sinne wirkt, spricht gegen diese Deutung, wenigstens solange nicht erwiesen ist, daß intravenöse Kochsalzzufuhr Magensekretion auslöst.

In der Tat hat Gruber noch auf eine andere Deutung hingewiesen: „Möglicherweise konnte sich ja auch die Sache so verhalten, daß das Chlornatrium als solches Natriumkarbonat aus dem Blut verdrängt und dadurch die Veränderung der Harnreaktion bedingt, diese sonach mit der Magensäuresekretion gar nichts zu tun hat." Doch hält Gruber diese Vorstellung nicht für wahrscheinlich, weil er in zwei Versuchen bei Hunger den Ausschlag

*) Virchows Archiv 56, 315.

**) M. Gruber, Über den Einfluß der Kochsalzzufuhr auf die Reaktion des Harns, Festschrift, Carl Ludwig zu seinem 70. Geburtstag gewidmet. Leipzig, F. C. W. Vogel, 1887, S. 67.

***) Jahresber. f. Tierchemie 1886, 179.

der Reaktion ausbleiben sah, „während gleichwohl, wie bei Nahrungsaufnahme an den ersten Tagen der Kochsalzzufuhr, Chlor im Körper zurückgehalten wird".

Behufs Entscheidung, welche von beiden Deutungen zutrifft — die Sekretions- oder die Verdrängungshypothese, wie wir sie kurz nennen wollen — mußte sichergestellt werden, ob der Magen bzw. seine sekretorische Leistung zum Auftreten der Alkaleszenz nach Kochsalzzufuhr unentbehrlich ist. Da der geradeste Weg, diese Frage zu entscheiden, nämlich Entfernung des Magens und nachträgliche Kochsalzzufuhr, wegen der geringen Widerstandsfähigkeit chlorarmer Tiere wenig Erfolg versprach, wurde zunächst eine andere Versuchsanordnung gewählt.

I. Einfluß der Einfuhr verschiedener Salze auf die Azidität des Harns im Chlorhunger.

Wenn die Verdrängungstheorie richtig ist, so steht zu erwarten, daß bei chlorarmen Tieren nicht bloß Kochsalz, sondern auch jedes andere Neutralsalz den Übertritt von Karbonat in den Harn zu bewirken vermag. Zur Prüfung dieser Frage hat bereits im Jahre 1898 Herr Max Rosell auf Wunsch von Prof. Hofmeister eine Reihe orientierender Versuche ausgeführt. Er verabreichte Hunden von mittlerer Größe, die durch Fütterung mit ausgekochtem Fleisch chlorarm gemacht waren, verschiedene Salze in großer Dosis innerlich und untersuchte, ob der Harn der nächsten 10 Stunden alkalisch wurde.

Es ergab sich folgendes:

Tabelle I.

Versuch	Zugeführtes Salz g	Verhalten des Harns
1	Bromnatrium 12	wird alkalisch
2	Jodnatrium 15	bleibt sauer
3	Natriumnitrat 10	„ „
4	„ 10	„ „
5	Natriumsulfat 30	„ „

Im Zusammenhalt mit den Erfahrungen von Falck und Gruber geht aus dieser Versuchsreihe hervor, daß bloß das Chlorid und Bromid den hervorgehobenen Einfluß auf die Reaktion des Harns besitzen. Da Herr Rosell aus äußeren Gründen die Untersuchung nicht weiterführen konnte, habe ich sie 1890 auf Vorschlag von Prof. Hofmeister neuerlich in Angriff genommen.

Über die von mir angewandte Methode sei kurz folgendes berichtet:

Die Chlorentziehung wurde in der von J. Forster*) angegebenen Weise durch Fütterung der Hunde mit ausgekochtem Fleisch und destilliertem Wasser bewerkstelligt. Manche Tiere bekamen eine Zulage von Speck. Zuweilen wurde ihnen zur Anregung des Appetits Fleischbrühedestillat gereicht.

Die fortschreitende Chlorverarmung wurde durch Kochsalzbestimmungen im Harn kontrolliert, die nach Salkowski-Mohr mit je 10 bis 20 ccm Harn ausgeführt wurden. Der bei den einzelnen Tieren erzielbare Kochsalzminimalgehalt des Harns schwankt, wie die anzuführenden Tabellen zeigen, zwischen 5 bis 14 cg pro Tag. Der Zeitpunkt, in der dieser Tiefstand erreicht wird, ist nicht bei allen Tieren gleich; es verstrichen bis dahin 10 bis 23 Tage.

In diesem Zustande von Chlorverarmung wurden nun den Tieren verschieden große Mengen von Neutralsalzen teils per os, teils, um die Magenschleimhaut zu umgehen, auf anderen Wegen, subkutan, intravenös, auch per rectum und durch direkte Injektion ins Duodenum beigebracht und der Einfluß dieser Maßnahmen auf die Reaktion des Harnes untersucht. Diese wurde durch direkte Titration von je 10 ccm mit Wasser auf 100 ccm verdünnten Harns mittels des Försterschen**) Indikators (Lackmoid-Malachitgrün) bestimmt. Der Farbenumschlag erfolgte präzis von blaugrün in gelbrot.

Die Verwendung des Försterschen Indikators empfiehlt sich wegen seiner relativ geringen Empfindlichkeit gegen schwache Säuren, bzw. saure Salze. Er zeigte bei normalem Harn, der gegen Lackmus sauer reagierte, alkalische Reaktion an, sodaß in unserem Fall alle Harne vor und nach Salzzufuhr mit Hilfe desselben Indikators titriert werden konnten. Da ferner die alkalische Reaktion der Salzharne, wie schon Falck gefunden hatte, von Alkalikarbonat bedingt ist, war die Verwendung eines gegen Kohlensäure recht unempfindlichen Indikators erwünscht, zumal da ein Austitrieren in der Hitze unter Austreiben der Kohlensäure sich beim Harn wegen der Zersetzlichkeit des Harnstoffs nicht empfiehlt. Soweit die Verwendung dieses Indikators einen Fehler veranlaßt, liegt er nach der Seite zu niedrig gefundener Alkaleszenzzahlen, sodaß die gefundenen hohen Werte um so beweisender erscheinen.

In den Tabellen sind die Titrationsergebnisse auf absolute und prozentische Werte des $n/_{10}$-Säureverbrauchs für die 24stündige Harnmenge umgerechnet (Gesamtalkaleszenz).

Versuch 6. Hund A. Kochsalz per os.

Fütterung mit 500 g frischem Pferdefleisch, das mit Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion ausgekocht war. Gewicht des Fleisches nach dem Kochen etwa 300 g.

---

*) J. Forster, Versuch über die Bedeutung der Aschebestandteile in der Nahrung. Zeitschr. f. Biologie 9, 297 (1873).

**) Vgl. Salaskin, Zeitschr. f. physiol. Chemie 25, 135 (1898).

Tabelle II.

Versuchstag	Gewicht kg	Zugeführt	g pro Kilo Tier	Gesamtharnmenge	Gesamt-ClNa g	Gesamtakaleszenz
1	15,0	—	--	400	2,010	96,0
2	—	—	—	325	0,920	78,0
3	—	—	--	300	1,081	63,0
4	—	—	—	310	1,054	86,8
5	—	—	—	330	0,462	99,0
6	—	—	—	285	0,513	82,7
7	—	—	—	270	0,270	85,6
8	12,2	—	—	330	0,248	87,5
9	—	—	—	275	0,165	47,5
10	—	—	—	250	0,125	41,5
11	12	2 g NaCl	0,17	385	0,578	69,3
12	—	—	—	295	0,325	59,0
13	—	—	—	250	0,225	40,5
14	—	—	—	335	0,168	56,6
15	—	—	—	310	0,140	58,3
16	—	—	—	300	0,135	49,2
17	10,8	10,8gClNa in 200 ccm H^2O	1,0	ca. 365	ca. 1,10	ca. 156,0

Aus vorstehender Tabelle geht zunächst hervor, daß, wie schon bekannt, bei reiner Fleischdiät der Harn immer saurer wird. Nach 17tägigem Chlorhunger hat das Tier ungefähr ein Drittel seines Körpergewichtes eingebüßt und geht trotz der größeren Kochsalzzufuhr an diesem Tage zugrunde. Die Verfallserscheinungen, Schwäche, Abmagerung, Durchfall, Conjunctivitis hatten in den drei letzten Tagen vor dem Tode rasch zugenommen.

Die kleine Dosis von 2 g Kochsalz, (11. Versuchstag), 0,17 g für 1 kg Körpergewicht, bewirkt bereits eine wahrnehmbare Alkaleszenzzunahme des Harns. — Sehr mächtig ist aber die Wirkung von 1 g Chlornatrium per Kilo Körpergewicht am 17. Chlorhungertag. Die Harnalkaleszenz schnellt um ungefähr das Dreifache empor. Der Harn braust, in Übereinstimmung mit den Beobachtungen der Autoren, auf Säurezusatz auf.

Zwanzig Stunden nach der Verabreichung des Kochsalzes geht das Tier zugrunde. Die Harnmenge dieses Versuchstages kann daher nur aus dem 20-Stundenwert berechnet werden. In der Harnblase des eben verendeten Tieres finden sich wenige Kubikzentimeter Harn, dessen Reaktion mit der des Harns am Tag vor dem Versuche übereinstimmt. Die durch die Kochsalzeingabe bewirkte Änderung der Harnalkaleszenz klingt also rasch ab.

Versuch 7. Bromnatrium per os.

Hund B. Täglich 300 g ausgekochtes Fleisch + 100 g Speck + 250 ccm destilliertes Wasser oder Fleischbrühedestillat.

Tabelle III.

Versuchstag	Gewicht kg	Zugeführtes Salz	g pro kg	Harnmenge 24 Std.	Gesamtalkaleszenz	NaCl im Harn g	
1	10,0	—	—	230	24,0	0,552	
2	—	—	—	220	22,0	0,455	
3	—	—	—	205	16,4	0,452	
4—9	—	—	—	—	—	—	
10	—	—	—	285	—	0,143	
11	—	—	—	290	17,4	0,087	
12	—	—	—	260	15,6	0,073	
13	9,8	5 g BrNa	0,51	293	15,6	—	entsprechend 0,2 g ClNa pro kg, Tier somnolent
14	—	—	—	275	55,0	—	

Der Harn vom 13. Versuchstage wurde in drei Portionen aufgefangen, deren Alkaleszenzwert ein deutliches Ansteigen von 1,1 bis 3,8 ccm für die 4stündige Harnmenge zeigte. Doch kommt die durch die BrNa-Zufuhr bedingte Alkaleszenzzunahme erst am 14. Versuchstage schlagend zum Ausdruck.

Versuch 8. Bromnatrium per os.

Hund D. Fütterung mit ausgekochtem Fleisch.

Tabelle IV.

Versuchstag	Gewicht kg	Zugeführtes Salz	g pro kg	Gesamtharn ccm	Gesamtalkaleszenz	NaCl im Gesamtharn	
1	10,6	—	—	400	96,0	0,954	
2	—	—	—	350	37,0	—	
3	—	—	—	310	55,8	—	
4—22	—	—	—	—	—	—	
23	—	—	—	300	48,0	0,053	
24	8,7	15,3 g BrNa	1,76	ca. 300	mindestens 138	—	
25	—	—	—	280	65	—	entsprechend 1,0 g NaCl pro kg. Leichter Sopor. Erholt.
26	—	—	—	—	—	—	

Die erste Harnportion nach BrNa-Zufuhr war mit flüssigem Kot verunreinigt und wurde daher nicht zur Titration benutzt. Die Gesamtakaleszenz des Tages wurde auf Grund der späteren Harnportionen berechnet.

Die Steigerung der Alkaleszenz tritt in diesem Falle schon am Versuchstage ein, hält aber noch am nächsten Tage an.

Versuch 9. Bromnatrium per os.

Hund 9. Ausgekochtes Fleisch.

Tabelle V.

Versuchstag	Gewicht kg	Zugeführt	g pro kg	Gesamtharn ccm	Gesamtalkaleszenz
1	12,2	—	—	600	120,0
2—17	—	—	—	—	—
18	—	—	—	520	114,4
19	10,0	17,6 g BrNa in 10 % Lösg.	1,76	540	172,8
20	—	—	—	425	119,0

Der Ausschlag ist in diesem Versuch minder groß. Der Versuchshund, ein altes Tier, hatte, wie bei anderweitigen Versuchen festgestellt worden war, einen sehr trägen Stoffwechsel. Auffallend ist, daß trotz fast dreiwöchentlicher Fleischdiät (1. bis 18. Versuchstag) der Säuregrad des Harns keine Zunahme zeigte.

Versuch 10. Jodnatrium per os.

Hund C. 600 g Fleisch, ausgekocht + 100 g Speck, öfters mit Fleischbrühedestillat und 500 ccm Wasser.

Tabelle VI.

Versuchstag	Gewicht kg	Zugeführt	g pro kg Tier	Gesamtharn ccm	Gesamtalkaleszenz	Gesamt-NaCl g	
1	17,2	—	—	400	—	—	
2—4	—	—	—	—	—	—	
5	—	—	—	390	—	0,234	
6—12	—	—	—	—	—	—	
13	—	—	—	360	35,0	0,160	
14	—	—	—	—	—	—	
15	—	—	—	380	30,4	0,080	
16	15,0	38,4 g JNa in 10 % Lsg.	2,56	420	33,6	—	entsprechend 1 g NaCl pro kg
17	—	—	—	—	—	—	Tier tot aufgefunden

Die Sektion ergab Gastroenteritis. Im Magen 25 ccm blutig tingierte Flüssigkeit, die keine freie HCl enthält. Im Harn vom 16. Versuchstage sehr reichlich Jod.

Trotz der großen Jodnatriumdosis fehlt die Alkaleszenzzunahme.

Diese Ergebnisse stehen, wie man sieht, mit jenen Rosells in Einklang. Im ganzen ergibt sich, daß bei Tieren im Chlorhunger wohl Zufuhr von Chlorid und Bromid, nicht aber von Jodid, Nitrat, Sulfat den Harn alkalisch macht. Dieser Befund ist aus der Verdrängungstheorie nicht gut zu erklären, während er sich aus der Sekretionstheorie direkt ableiten läßt, wenn man

sich erinnert, daß die Magenschleimhaut wohl reichlich Chlor- und Bromwasserstoff zu sezernieren vermag, Jodwasserstoff aber nur in Spuren, Schwefelsäure überhaupt nicht*).

II. Versuche mit nicht chlorarmen Tieren.

Aus den Versuchen Grubers geht hervor, daß die Kochsalzzufuhr nur bei chlorarmen Tieren den Harn alkalisch macht, denn die Erscheinung tritt nach großen Kochsalzgaben nur am ersten Tage ein; meist schon am zweiten und immer am dritten Tage hat bei gleichbleibender Kochsalzzufuhr der Harn sein gewöhnliches Verhalten wiedergewonnen. Auch Herr Rosell vermißte auf eine Dosis von 30 g Kochsalz bei einem mit gemischtem Futter genährten Hunde das Auftreten der Alkaleszenz.

Damit ist aber nicht ausgeschlossen, daß sich das Bromid anders verhält.

Versuch 11. Bromnatrium und Chlornatrium per os.

Hund J. Gemischtes Futter.

Tabelle VII.

Versuchstag	Gewicht kg	Zugeführt	g pro kg	Gesamtharn ccm	Gesamtalkaleszenz	
1	3,6	—	—	260	36	
2	—	—	—	180	22	
3	3,5	5 g BrNa in 5 °/₀ Lsg.	0,87	285	40	entsprechend 0,5 g ClNa pro kg Tier
4	—	—	—	210	29	
5	—	—	—	245	34	
6—11	—	—	—	—	—	
12	—	—	—	255	25	
13	3,4	3,4 g ClNa in 5 °/₀ Lsg.	1,0	310	39	
14	—	„	—	270	30	

Versuch 12. Bromnatrium per os.

Hund E. Gemischtes Futter.

Tabelle VIII.

Versuchstag	Gewicht kg	Zugeführt	g pro kg	Gesamtharn ccm	Gesamtalkaleszenz	
1	—	—	—	200	32,0	
2	12,3	10,82 BrNa in 5 °/₀ Lösg.	0,88	255	52,5	entsprechend 0,5 g ClNa pro kg
3	—	—	—	210	42,0	

*) E. Külz, Können von der Schleimhaut des Magens auch Bromide und Jodide zerlegt werden? Zeitschr. f. Biol. 23, 460 (1887). — K. Trappe, Über Säurebildung im Magen. Diss. Halle 1892. — Nencki und Schoumow-Simanowsky, Studien über das Chlor und die Halogene im Tierkörper. Arch. f. exp. Path. u. Pharmakol. 34, 313 (1894).

Versuch 13. Bromnatrium und Chlornatrium per os.

Hund F. Gemischtes Futter.

Tabelle IX.

Versuchstag	Gewicht kg	Zugeführt	g pro kg	Gesamtharn ccm	Gesamtalkaleszenz	
1	—	—	—	205	45,1	
2	7,3	12,85 g BrNa in 5 % Lsg.	1,76	225	112,5	entsprechend 1 g ClNa pro kg
3	—	—	—	150	121,6	Futter und Wasser entzogen
4	—	—	—	125	52,8	
5	—	—	—	110	32,5	
6—27	—	—	—	—	—	
28	—	—	—	350	98,0	
29	7,9	7,9 g ClNa	1,0	420	102,0	
30	7,8	13,7 g BrNa	1,76	mindestens 510	236,1	entsprechend 1 g ClNa pro kg Tier
31	—	Tier verendet	—	—	—	Harn reich an Karbonat

Aus Versuch 12 und 13 ist zu ersehen, daß Bromnatrium in großen Dosen auch bei nicht chlorarmen Tieren den Harn alkalisch machen kann.

Es war nun von Interesse, auch den Einfluß dieser Salze bei anderer als innerlicher Einführung kennen zu lernen.

Versuch 14. Bromnatrium intravenös.

Hund K. Gemischtes Futter, 12stündliche Beobachtungsperioden.

Tabelle X.

Stdn.	Gewicht kg	Zugeführt	g pro kg	Gesamtharn	Gesamtalkaleszenz	
1—12	—	—	—	210	74	
13—24	14,2	12,5 g BrNa in 10 % Lösg.	0,87	290	125	Entsprechend 0,5 g ClNa pro kg
24—36	—	—	—	175	61	Somnolenz

Versuch 15. Bromnatrium, Chlornatrium, Natriumnitrat bei verschiedener Applikationsart.

Hund H. Gemischtes Futter.

Tabelle XI.

Versuchstag	Gewicht kg	Zugeführt	Applikationsart	g pro kg	Gesamtharn	Gesamtalkaleszenz	
1	12,0	—	—	—	960	115	
2	—	—	—	—	1020	122	
3	11,7	20,59 g Br Na in 200 ccm	per rectum	1,76	—	—	entsprechend 1,0 g Cl Na pro kg, Bestimmung infolge von Durchfall verhindert.
4	—	—	—	—	840	118	
5	11,5	10,12 g Br Na in 100 ccm	per rectum	0,88	1115	134	entsprechend 0,5 g Cl Na pro kg. Das Klysma gut behalten. In den nächsten 24 Stdn. keine Entleerung.
6	—	—	—	—	985	99	
7	11,8	10,38 g Br Na in 200 ccm	per os	0,88	1200	192	entsprechend 0,5 g Cl Na pro kg.
8	—	—	—	—	—	—	
9	—	—	—	—	—	—	
10	—	—	—	—	750	120	
11	—	—	—	—	935	150	
12	12,6	22,1 g Br Na in 10% Lsg.	subkutan	1,76	1060	212	entsprechend 1,0 g Cl Na pro kg.
13	—	—	—	—	1100	178	
14	—	—	—	—	950	135	
15	12,8	11,26 g Br Na	subkutan	0,88	890	128	entsprechend 0,5 g Cl Na pro kg.
16	—	—	—	—	975	142	
17	12,4	18 g $NaNO_3$	per os	1,45	1020	163	entsprechend 1,0 g Cl Na pro kg.
18	—	—	—	—	915	129	
19	12,2	10,74 g Br Na in 200 ccm	intravenös	0,88	1100	168	entsprechend 0,5 g Cl Na pro kg.
20	—	—	—	—	1055	148	
21	—	—	—	—	1200	174	
22	—	—	—	—	1005	152	
23	12,8	12,8 g Na Cl 5% Lösg.	intravenös	1,0	1330	221	
24	—	—	—	—	1080	166	

Versuch 16. Chlornatrium intravenös.

Hund J. Gemischte Kost; Gewicht 3,5 kg. Injektion von 3,5 g (1 g pro kg) in die Cruralvene. Harn vor der Injektion 180 ccm mit einer Gesamtalkaleszenz von 39 ccm. — Harn 8 Stunden nach der Injektion 155 ccm mit einer Gesamtalkaleszenz von 34 ccm n/10-Alkali.

Versuch 17. Bromnatrium ins Duodenum und per os.

Hund Q. Gemischte Kost. In Äthernarkose Laparotomie unter aseptischen Kautelen. Durchstechen der Wand einer Schlinge des oberen Dünndarms mit spitzer Metallkanüle, die mit einer Bürette verbunden ist.

Tabelle XII.

Versuchstag	Gewicht kg	Zugeführt	Applikationsart	g pro kg	Gesamtharn	Gesamtalkaleszenz	
1	—	—	—		310	93	
2	5,0	8,8 BrNa in 5%Lsg.	in Duodenum	1,76	280	**129**	entspr. 1 g ClNa pro kg
3	—	—	—	—	255	98	
4	—	—	—	—	210	80	
5	—	8,8 g BrNa in 5%Lsg.	per os	1,76 —	305	**152**	entspr. 1 g ClNa pro kg 24 stünd. Karenz
6	—	—	—		270	121	
7	—	—	—	—	245	108	

Die Versuche 14 bis 17 lehren, daß sich der Einfluß der Bromnatriumzufuhr auf die Reaktion des Harns nicht bloß bei Applikation per os geltend macht, sondern auch nach Einführung in die Vene (Versuch 14) und unter die Haut (Versuch 15, 12. Versuchstag); aber auch die Applikation ins Duodenum (Versuch 17) und per rectum (Versuch 15, 5. Tag) läßt eine Zunahme der Alkaleszenz nicht verkennen.

Daß auch beim nicht kochsalzarmen Tier eine reichliche Kochsalzinfusion wirksam sein kann, zeigt Versuch 15 (23. Versuchstag).

III.

Das Verhalten des Hundeorganismus im Chlorhunger nach Einfuhr von Chlorid und Bromid ist einigermaßen dem eines Reagens zu vergleichen, welches so große Verwandtschaft zu Chlor und Brom besitzt, daß es sie dem Chlornatrium und Bromnatrium zu entreißen vermag. Wenn bei normalen nicht chlorarmen Tieren diese Affinität gegen Chlornatrium nicht, oder nur unter besonders günstigen Verhältnissen hervortritt, während sie sich gegen Bromnatrium geltend macht, so muß man den Grund dieser Verschiedenheit zunächst darin suchen, daß bei normalem Chlorgehalt der

Gewebe die Affinität für Cl-Ionen schon befriedigt, jene für die körperfremden Br-Ionen wenigstens zum Teil noch ungesättigt ist. Dabei kann überdies die ungleich starke Affinität beider Halogene eine Rolle spielen.

Welcher Art nun dieser halogenbindende Stoff sein, und wo er seine Wirkung im Hundeorganismus entfalten mag, bedarf einer weiteren Untersuchung. Die scheinbar nächstliegende Vorstellung, daß dem Auftreten der Alkaleszenz eine gleichzeitige Abgabe einer entsprechenden Menge von Chlorwasserstoff oder Bromwasserstoff im Magen entspräche, läßt sich nicht mit allen Tatsachen in Einklang bringen. Zwar scheint dafür der Umstand zu sprechen, daß sich die Erscheinung am stärksten bei Applikation per os zeigt, da hier das eingeführte Salz in größerer Menge mit der Magenmucosa in Berührung kommt als bei intravenöser und subkutaner Applikation, wo eben nur ein Bruchteil durch das Blut der Magenmucosa zugeführt wird; allein dies kann allenfalls dafür geltend gemacht werden, daß die Magenmucosa überhaupt daran beteiligt ist, liefert aber keinen genügenden Beweis, daß in der Tat eine Sekretion stattfindet. Namentlich bei intravenöser und subkutaner Applikation ist nach den Erfahrungen von Pawlow und seinen Schülern über die Abhängigkeit der Sekretion vom Nervensystem eine dadurch eingeleitete reichliche Magensaftsekretion wenig wahrscheinlich.

Ich habe durch folgenden Versuch die Frage zu entscheiden gesucht.

Versuch 18.

Hund B, 10 kg schweres, seit 8 Tagen mit ausgekochtem Fleisch gefüttertes Tier erhielt am 9. Versuchstag, vor der gewöhnlichen Fütterungsstunde, mittels Schlundsonde 1 Liter körperwarmes destilliertes Wasser. $^1/_4$ Stunde später wurden unter leisem Druck auf die Magengegend von außen 520 ccm wieder ausgehebert. In diesem Magenspülwasser war freie HCl nachweisbar (Günsburg, Tropäolin usw.); durch Titration mit $^n/_{10}$-NaOH ergab sich ein HCl-Gehalt von 0,09 g. Am nächsten Tage wurde dieser Versuch wiederholt, nur unter Zusatz von 10 g NaCl; entleert wurden aus dem Magen 450 ccm Flüssigkeit mit einem HCl-Gehalt von nur 0,062 g. Eine vermehrte Säureausscheidung gegenüber dem Cl-freien Tag ist somit sicher nicht vorhanden. Trotzdem in diesem Fall der größere Teil der eingeführten ClNa-Lösung wieder ausgehebert worden war (er enthielt 5,5 g NaCl), so konnte doch eine deutliche Zunahme der Harnalkaleszenz (von 19,2 auf 28,8 ccm $^n/_{10}$-HCl) bemerkt werden, während zugleich der Cl-Gehalt des Harns von 0,060 g pro Tag auf 1,777 anstieg.

Dieser Versuch spricht nicht für eine der Alkaleszenz parallel gehende Sekretion, sondern eher für eine Aufspeicherung der abgespaltenen Chlorionen. Ist diese Vorstellung richtig, so könnte

man sich über den gesamten Vorgang folgende Meinung bilden. Die im Chlorhunger befindliche Magenschleimhaut reißt, auch wenn sie nicht sezerniert, die bei Kochsalzzufuhr ihr zuströmenden Cl- bzw. Br-Ionen rasch mit großer Begierde an sich, um sie in einer indifferenten Form für die durch das Nervensystem auszulösende Sekretion aufzuspeichern. Dieser Vorgang vollzieht sich auch unter normalen Verhältnissen, aber kontinuierlich, und übt daher auf die Reaktion des Harnes keinen Einfluß aus. Während der Sekretion verhält sich die normale Schleimhaut wie beim Tiere im Chlorhunger. Während sie auf der einen Seite durch Salzsäureabgabe an Chlor verarmt, bindet sie auf der anderen Seite aus dem Blute stammende Chlorionen und veranlaßt so eine gesteigerte Alkaleszenz des Harns.

Leider habe ich den zuletzt angeführten Versuch nicht mehr wiederholt und auch bisher nicht Zeit gefunden, andere zur Aufklärung der Sachlage geplante Untersuchungen zu Ende zu führen*).

*) Anmerkung des Herausgebers: Verfasser hat noch eine große Anzahl mühevoller Bestimmungen über die Aufnahme von Chlor und Brom durch die Magenmucosa ausgeführt, die jedoch nicht zu bindenden Schlußfolgerungen geführt haben. Sein dringender Wunsch, die Arbeit durch weitere, in anderer Richtung geplante Versuche abzurunden, ging nicht in Erfüllung. Um Ostern dieses Jahres setzte zum Leidwesen aller, die ihn kannten, eine tückische Erkrankung dem Wirken des arbeitsfreudigen und erfolgreichen jungen Forschers ein frühzeitiges Ende.

V.

Über das Verhalten der Eiweißkörper des Blutplasmas bei experimentellen Infektionen.

Von Dr. **Leo Langstein** und Dr. **Martin Mayer.**

Aus dem Laboratorium der hydrotherapeutischen Anstalt der Universität Berlin. (Leiter Geheimrat Professor L. Brieger.)

So frühzeitig sich schon die Erkenntnis Bahn gebrochen hat, daß durch das Studium der Veränderungen des Blutes in physiologischen und pathologischen Zuständen wertvolle Aufschlüsse für das Verständnis der verschiedenartigsten Krankheitsprozesse gewonnen werden können, so wechselten doch naturgemäß die Gesichtspunkte der Betrachtungsweise erheblich mit der gerade herrschenden wissenschaftlichen Richtung.

Mit der Entdeckung der Serumphänomene, die den letzten Jahren vorbehalten war, begann das Interesse für das Studium der morphologischen Bestandteile zu erkalten und sich wieder mehr dem der Blutflüssigkeit, speziell der in ihr gelösten Eiweißkörper, zuzuwenden. Krehl sagt in seiner pathologischen Physiologie: „Sicher wird die Betrachtung des Serumeiweißes noch die weitgehendste Bedeutung gewinnen", aber er fügt an anderer Stelle hinzu, „wir müssen uns, wenn aus Variationen des Blutserums Schlüsse auf das Verhalten der Interzellularsubstanz gezogen werden, immer sehr wohl des Unterschiedes zwischen Serum und Plasma erinnern". Gerade durch diesen Ausspruch wird die Lücke, die sich in fast allen neueren Untersuchungen über die gelösten Eiweißkörper des Blutes findet, treffend gekennzeichnet.

In den nachstehend mitgeteilten Untersuchungen verfolgten wir den Zweck, die quantitativen Veränderungen der Eiweißkörper des Blutplasmas bei Tieren zu studieren, die durch Impfung mit verschiedenen pathogenen Mikroorganismen teils krank gemacht, teils immunisiert worden waren. Da hier die Methodik der quantitativen Fibrinogenbestimmung zum ersten Male zur Untersuchung des Blutes bei pathologischen Zuständen (künstlicher Infektion) herangezogen wurde, so läßt sich durch das Ergebnis der Versuche zugleich eine richtige Anschauung über das oft

studierte Verhältnis von Globulin zum Albumin gewinnen, da sich der Gehalt an Fibrinogen, wie wir vorwegnehmen wollen, durchaus nicht als konstant erwies. An die Besprechung der Methodik unserer Untersuchungen und ihrer Ergebnisse wird sich die Erörterung auf Grund der bereits vorliegenden Befunde anschließen.

Methodik:

Als Versuchstiere dienten ausschließlich Kaninchen, die unter den gleichen Ernährungsbedingungen gehalten wurden, teilweise Tiere vom gleichen Wurf. Der Meinung Burckhardts, daß Kaninchen zum Studium der Veränderungen ihrer Bluteiweißkörper nicht geeignet seien, da die Quantität derselben normalerweise große Schwankungen, besonders das Globulin betreffend, zeige, können wir uns auf Grund einer beträchtlichen Versuchsreihe an Normaltieren nicht anschließen. Unsere Resultate stehen in Übereinstimmung mit denen Hammarstens, der ein ziemlich konstantes Verhältnis zwischen Globulin und Albumin bei Kaninchen feststellte. Die Technik der Blutentnahme war folgende:

An dem chloroformierten Tier wurde die Carotis in Ausdehnung von etwa 1 cm frei gelegt und durch zwei Seidenschlingen fixiert. Dann wurde ein kleiner Scherenschnitt in die Wand gemacht und das im Strahle ausspritzende Blut in einem mit 3proz. Fluornatriumlösung beschickten Meßgefäß aufgefangen, und zwar in einer solchen Menge, daß eine 0,5 bis 0,6proz. Fluornatriumplasmalösung entstand. Dann wurde die Carotis doppelt unterbunden und die Hautwunde durch Naht vereinigt.

Man kann auf diese Weise mittelschweren Kaninchen 30 ccm Blut aus der Carotis entnehmen, ohne daß, natürlich bei aseptischem Vorgehen, deren Fortleben in Frage gestellt ist. Es wurde absichtlich von einer Entnahme des Blutes aus einer Ohrvene abgesehen, da sich dabei die Gerinnung desselben nur schwer vermeiden läßt. Es empfiehlt sich nicht, durch Rühren mit einem Glasstab Blut und Fluornatriumlösung zu mischen, da dabei manchmal doch kleinste fädige Gerinnungen auftreten; ein- bis zweimaliges Umschwenken des Gefäßes genügt zur gleichmäßigen Verteilung.

Die Blutmischung wird für 24 Stunden in den Eisschrank gebracht, das abgesetzte klare Plasma abgehebert, ein Rest durch Zentrifugieren gewonnen. Es wurde jedesmal die Masse der abgesetzten Blutkörperchen durch Eintragen in destilliertes Wasser auf etwaige Gerinnselbildung untersucht und bei zweifelhaftem Befund von einer Verwertung des betreffenden Versuches abgesehen.

Neben normalen Tieren kamen mit Typhus, Schweinerotlauf, Pneumococcen, Streptococcen, Dysenterie und Cholera infizierte Tiere zur Untersuchung. Die Protokolle der Tierbehandlung sind am Schlusse beigefügt.

Zur quantitativen Bestimmung des Fibrinogens neben dem Globulin kam die durch Hofmeister und seine Schule einge-

führte fraktionierte Ausfällung mit neutraler Ammonsulfatlösung zur Anwendung*). Reye hat gefunden, daß Blutplasma einen Eiweißkörper enthält, „dessen Fällung bei dem Zusatz von 1,5 bis 1,7 ccm Ammonsulfatlösung pro 10 ccm bei 2 ccm Plasma beginnt und bei etwa 2,5 bis 2,7 Ammoniumsulfat beendet ist". Diese Trübung und Flockenbildung stammt nach Reye, da sie nur im Plasma reichlich auftritt, unzweifelhaft vom Fibrinogen. Bei der Nachprüfung der Versuche Reyes an normalem Kaninchenblutplasma konnten wir seine Angaben in bezug auf die Fällungsgrenzen des Fibrinogens vollkommen bestätigen. Da die Ausfällung des Globulins nach unseren Versuchen bei 2,9 ccm Ammonsulfat in 10 ccm Lösung eben beginnt, bei 3,1 ccm Ammonsulfat jedoch erst deutlich wird, ließ sich das Globulin neben dem Fibrinogen in derselben Plasmaprobe mit hinreichender Genauigkeit bestimmen.

Der Gang der Untersuchung war demnach in Anlehnung an das von Hofmeister, Pohl, Reye ausgearbeitete Verfahren der folgende:

Je 10 ccm Fluornatriumplasma wurden mit 25 ccm destillierten Wassers und 13,4 ccm gesättigter neutraler Ammonsulfatlösung versetzt, und der sich binnen kurzem bei Eiskälte absetzende Niederschlag auf ein gewogenes Filter gebracht. Dieses wurde mit der entsprechend verdünnten Ammoniumsulfatlösung so lange gewaschen, bis das Waschwasser (Nr. 1) auch nicht mehr die Spur einer Biuretreaktion zeigte. Das lufttrockene Filter wurde darauf für 12 Stunden im Trockenofen bei 85° belassen, der jetzt koagulierte und daher unlöslich gewordene Niederschlag mit heißem Wasser so lange gewaschen, bis das Filtrat schwefelsäurefrei war, der mit Alkohol und Äther behandelte Niederschlag dann bei 105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Das Filtrat vom Fibrinogenniederschlag wurde mit dem ersten Waschwasser vereinigt, der Gehalt der Lösung an Ammonsulfat berechnet und zu demselben soviel gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugesetzt, daß eine halb gesättigte Lösung resultierte. Das ausfallende Globulin wurde dann in der gleichen Weise wie das Fibrinogen behandelt. Das Filtrat vom Globulin, mit dem Waschwasser vereinigt, wurde nach schwachem Ansäuern mit Essigsäure aufgekocht, das ausgeschiedene Serumalbumin durch Wägung wie früher bestimmt. Das Filtrat von diesem wurde stets auf Albumosen bzw. Pepton untersucht.

Wir haben es, wie man sieht, vorgezogen, das Eiweiß durch direkte Wägung zu bestimmen und im Interesse größerer Genauigkeit auf Stickstoffbestimmungen verzichtet. Daß der aus den Stickstoffzahlen sich ergebenden indirekten Bestimmung des Eiweißgehaltes notwendigerweise Fehler anhaften müssen, haben schon von Limbeck und F. Pick, wie auch Bleibtreu betont.

*) Brieger und Ehrlich haben bekanntlich das Ammonsulfat zur Darstellung der Toxine angewendet.

Tabelle I.

Gehalt des Fluornatriumplasmas an Eiweißkörpern berechnet auf 12 ccm Plasma.

Versuchstiere	Fibrinogen	Globulin	Summe von Fibrinogen und Globulin	Albumin	Verhältnis von Globulin zu Albumin	Verhältnis der Summe von Fibrinogen und Globulin zu Albumin	Verhältnis von Fibrinogen zu Globulin	Gesamteiweiß	Bemerkungen
Normaltiere									
1	0,0321	0,1237	0,1558	0,3203	1 : 2,58	1 : 2,05	1 : 3,85	0,4761	
2	0,0208	0,1357	0,1565	0,3195	1 : 2.36	1 : 2,04	1 : 6,52	0,4760	
3	0,0199	0,1026	0,1225	0,3689	1 : 3,59	1 : 3,01	1 : 5,16	0,4914	
4	0,0177	0,1222	0,1399	—	—	—	1 : 6,90	—	
5	0,0145	0,1010	0,1155	0,3485	1 : 3,45	1 : 3,01	1 : 6,99	0,4640	
6	0,0237	—	—	0,3385	—	—	—	—	
7	0,0257	—	—	0,3501	—	—	—	—	
8	0,0194	0,1388	0,1582	0,3220	1 : 2,32	1 : 2,03	1 : 7,15	0,4802	
Typhus									
1	0,0096	0,2671	0,2767	—	—	—	1 : 27,71	—	aggl. 1 : 8000.
2	0,0340	0,2495	0,2835	0,2972	1 : 1,19	1 : 1,04	1 : 7,34	0,5807	aggl. 1 : 4000.
3	0,0538	0,1704	0,2242	0,3048	1 : 1,78	1 : 1.80	1 : 3,16	0,5290	aggl. 1 : 5000.
4	0,0280	0,1400	0,1680	—	—	—	1 : 5,00	—	nach dreitägiger Behandlung in schwerkrankem Zustande entblutet.
5	—	0,1742	—	0,2869	1 : 1,65	—	1 : 2,60	—	aggl. 1 : 2000.
6	0,0595	0,1548	0,2143	0,2958	1 : 1,91	1 : 1,33	—	0,5101	aggl. 1 : 1500.
Pneumococcen									
1	0,1232	0.1643	0,2875	0,2432	1 : 1,48	1 : 0,84	1 : 1,33	0,5307 }	36 Stunden nach Infektion in schwerkrankem Zustande getötet.
2	0,0958	0,1727	0,2685	0,2460	1 : 1,42	1 : 0,91	1 : 1,80	0,5145 }	
Streptococcen									
1	0,0480	0,1865	0,2345	0,2867	1 : 1,53	1 : 1,22	1 : 3,88	0,5212	
2	0,0723	0,2010	0,2733	0,2846	1 : 1,41	1 : 1,03	1 : 2,79	0,5579	
Dysenterie									
1	0,0121	0,1091	0,1212	0,3085	1 : 2,82	1 : 2,52	1 : 9,01	0,4297	mit Bakterienfiltrat behandelt, aggl. 1 : 800.
Cholera									
1	0,0336	0,1402	0,1738	0,3602	1 : 2,56	1 : 2,05	1 : 4,16	0,5340	mit filtrierter Kochsalz-Bakterienaufschwemmung nach 48stündig. Autolyse bei 37° behandelt; aggl. 1 : 200; schützt im Pfeifferschen Versuch in Verdünnung von 1 : 5000.
Schweinerotlauf									
1	0,0261	0,1472	0,1733	0,3175	1 : 2,15	1 : 1,83	1 : 5,64	0,4908	
2	0,0455	0,2481	0,2926	0,2664	1 : 1,08	1 : 0,91	1 : 5,57	0,5590	
3	0,0352	0,2121	0,2473	0,2707	1 : 1,27	1 : 1,09	1 : 6,02	0,5180	

Leider ist es bei der angewendeten Methodik nicht möglich, den Reststickstoff im Blute, den man auf Grund neuerer Arbeiten mehr als bisher wird berücksichtigen müssen, zu bestimmen; und ein Versuch, die Fraktionierung mit Zinksulfat durchzuführen, zeitigte kein Resultat wegen des Mangels scharfer Fällungsgrenzen.

Die vorstehende Tabelle gibt den Gehalt des Plasmas an seinen Eiweißkörpern, wobei wir nur bemerken, daß zum Zwecke des Vergleiches mit Reyes Resultaten sämtliche Werte auf 12 ccm Fluornatriumplasma bezogen sind.

Daß eine Änderung des quantitativen Verhaltens der Plasmaeiweißkörper in direktem, kausalem Zusammenhange mit der Infektion steht und nicht auf Zufälligkeiten beruht, geht aus Versuchen hervor, in denen wir Tieren in drei- bis vierwöchentlichen Intervallen, ohne daß inzwischen eine Änderung ihrer Lebensweise erfolgt wäre, in gesundem Zustande Blut zur quantitativen Untersuchung entnahmen. Tabelle II gibt darüber Aufschluß.

Tabelle II.

	Fibrinogen	Globulin	Albumin	Gesamteiweiß
Normaltier II	0,0208	0,1357	0,3195	0,4760
dto. nach 4 Wochen	0,0192	0,1298	0,3346	0,4836
Normaltier IV	0,0145	0,1010	0,3485	0,4640
dto. nach 3 Wochen	0,0163	0,1207	0,3396	0,4766

Es sei dahingestellt, ob die tatsächlich beobachteten geringen Differenzen beim selben Tiere noch in die Fehlergrenze fallen oder ob die beobachteten Schwankungen physiologisch bedingt sind.

Aus Zweckmäßigkeitsgründen soll bei der Besprechung der Versuche zuerst auf das Fibrinogen eingegangen und hinterher das wechselnde Verhältnis von Globulin zum Albumin kritisch beleuchtet werden.

Über das Verhalten des Fibrinogens.

Man hat in früherer Zeit viel mehr, als das heute der Fall ist, auf das Verhalten des Fibrins geachtet und aus einer Vermehrung bzw. einer Verminderung seiner Menge die weitgehendsten Schlüsse gezogen. Verdanken wir doch gerade den Hämatopathologen die Einführung der Begriffe Hyperinose und Hypinose. Andral und Gavarret teilten die fieberhaften Erkrankungen in zwei Gruppen, in „Pyrexien" und „Phlegmasien" ein: Erstere mit normalem oder vermindertem Gehalt an Fibrin (Hypinose nach Simon), zu denen sie Typhus, Scharlach, Masern, Variola, Malaria

rechneten; also fieberhafte Erkrankungen ohne lokale Herde; letztere mit gesteigertem Fibringehalt, Pneumonie, Gelenkrheumatismus, Phlegmone, Entzündungen der Schleimhäute des Respirationtraktes und der serösen Häute usw., also Fieber mit lokalen Herden. Nicht immer führten quantitative Bestimmungen zur Annahme einer Vermehrung des Fibrins, sondern man begnügte sich, als Ausdruck derselben das Auftreten der sogenannten Crusta phlogistica anzusehen, d. i. Ausscheidung des Faserstoffes ohne Einschluß von Blutkörperchen. Während das Blut des gesunden Menschen nach zahlreichen Analysen der genannten Forscher 0,1 bis 0,4 Gewichtsprozent Fibrin enthält, beobachteten sie als Ausdruck der Hyperinose Steigerungen bis 1 resp. 1,3 Proz. und als Ausdruck der Hypinose Verminderungen angeblich bis zu völligem Verschwinden, wofür in der Literatur als Beispiel ein Fall von hämorrhagischen Pocken angeführt wird. Die Angaben von Andral und Gavarret wurden im allgemeinen bestätigt. So fanden Becquerel und Rodier eine Vermehrung des Fibringehaltes in fieberhaften Erkrankungen, bei Typhus auch manchmal eine Verminderung. Lackschewitz fand Vermehrung des Fibrins bei Pneumonie; Berggrün bei Pneumonie, Pleuritis, Tuberkulose, Gelenkrheumatismus. Halliburton gibt an, daß Pneumonie, Pleuritis, Gelenkrheumatismus, Erysipel mit einer Zunahme des Fibrinogens einhergehen.

Allen diesen Bestimmungen haften jedoch Fehler an, die durch die Beschaffenheit des Fibrins gegeben sind. Zu diesen gehören nicht nur die Schwierigkeiten des Auswaschens, das zähe Anhaften corpusculärer Elemente, sondern auch die konstante Verunreinigung mit einem Eiweißkörper, der dem Fibrin nur durch verdünnte Ammoniaklösung entzogen werden kann, worauf erst in jüngster Zeit W. Heubner hingewiesen hat. Daher kommt den Fibrinbestimmungen von Pfeiffer, die nach einer von ihm gemeinsam mit Koßler an der Klinik von F. Kraus ausgearbeiteten Methodik angestellt sind, eine besondere Bedeutung zu. Koßler und Pfeiffer verfuhren in der Weise, daß sie den Gehalt an Fibrin aus der Stickstoffdifferenz von Plasma und Serum berechneten. Sie benutzten 0,2 proz. Kalium-Oxalatplasma. Auf Grund zahlreicher Bestimmungen unterscheidet Pfeiffer zwei Gruppen von Fällen, solche mit dem normalen Fibrinstickstoff nahestehenden Zahlen — hierher rechnet er Typhus, Malaria, Sepsis (ohne lokale Eiterherde), Nephritis (Urämie) und solche mit Vermehrung des Fibrinstickstoffes — Pneumonie, Gelenkrheumatismus, Erysipel, Scharlach, Peritonitis. Die höchsten Werte fand er in sechs Pneumoniefällen.

Durch die grundlegenden Arbeiten von Alexander Schmidt wissen wir, daß zur Gerinnung des Blutes außer den überall vorhandenen Salzen zum mindesten die Gegenwart von zwei Körpern notwendig ist, von denen die fibrinbildende Substanz durch die Gegenwart der anderen zu Fibrin umgewandelt wird. Heutzutage gewinnt die besonders von Schmiedeberg vertretene Anschauung, daß das Fibrin einer hydrolytischen Spaltung des Fibrinogens seine Entstehung verdanke, immer mehr Boden, wofür insbesondere die oben erwähnte Untersuchung Heubners ein Beleg ist. Es wäre ein grober Fehler, aus dem Ausbleiben der Fibringerinnung in einem Blute oder aus geringen Mengen gebildeten Fibrins irgend welche Schlüsse zu ziehen. Denn die Gerinnung hängt ja nicht nur von der Anwesenheit des Fibrinogens ab, sie kann auch ausbleiben, sei es wegen des Fehlens des Fermentes, oder wegen der Anwesenheit gerinnungshemmender Agentien. Daher bedeutet die Arbeit Reyes, der eine quantitative Methode zur Bestimmung des Fibrinogens ausarbeitete, einen großen Fortschritt; denn die Anwendung derselben auf pathologische Verhältnisse ermöglicht die Entscheidung, ob vermehrte bzw. verminderte Ausscheidung des Fibrins eine ihrer Ursachen in quantitativen Änderungen der Muttersubstanz hat.

Reye untersuchte nur Rindsplasma auf seinen Gehalt an Fibrinogen und fand in vier Versuchen 0,0420 bis 0,0424 g Fibrinogen in 12 ccm Plasma. Der Gehalt des Kaninchenplasmas an Fibrinogen ist nach unseren Versuchen ein geringerer und schwankt in einer physiologischen Breite von 0,0145 g bis 0,0321 g in je 12 ccm. Typhustiere zeigen im großen und ganzen dieselben Schwankungen wie die Normaltiere; bemerkenswert muß es allerdings erscheinen, daß dasjenige Typhustier, dessen Serum am stärksten agglutinierte, die absolut geringste Fibrinogenmenge hatte (0,0096). Da dieser Fall jedoch vereinzelt blieb, möchten wir ihm keine prinzipielle Bedeutung zuerkennen und ihn nur mit Rücksicht auf die vielbemerkte Hypinose bei Typhus besonders erwähnen. Auch die mit Cholera, Dysenterie und Schweinerotlauf geimpften Tiere zeigen in ihrem Fibrinogengehalt keine Abweichung von der Norm. Eines der mit hochvirulenten Streptococcen geimpften Kaninchen zeigte den auffallend hohen Fibrinogenwert von 0,0723. Besonders bemerkenswert ist jedoch das Verhalten des Fibrinogens im Plasma der mit Pneumococcen geimpften Tiere. Der Wert des Fibrinogens steigt hier auf 0,0958 bzw. 0,1232, übertrifft somit im zweiten Falle den Globulinwert der meisten untersuchten Normaltiere. Fassen wir diese

Befunde zusammen, so ergibt sich eine interessante Parallele zu den Untersuchungen Pfeiffers, der in seinen Pneumoniefällen die höchsten Werte an Fibrinstickstoff fand. Da die Kaninchen, die mit Pneumococcen infiziert werden, keine Pneumonien zeigen, sondern an Pneumococcensepsis zu Grunde gehen, müssen wir in der Fibrinogenvermehrung eine spezifische Eigenschaft des Pneumonieerregers erblicken und wenigstens eine Komponente der bei Pneumonie beobachteten Fibrinvermehrung in der Steigerung der Muttersubstanzmenge sehen. Für diese spezifische Eigenschaft des Pneumococcus sprechen auch jene erst in jüngster Zeit gemachten Erfahrungen der Pathologen, die beobachtet haben, daß unter den Peritonitiden die durch den Pneumococcus bedingten mit der stärksten Fibrinexsudation einhergehen.

Über das Verhalten des Eiweißquotienten (Globulin zu Albumin) und des Gesamteiweißgehaltes des Plasmas.

Schon unter normalen Verhältnissen zeigt der Eiweißquotient des Serums bei verschiedenen Tierspezies große Differenzen, wie aus Analysen zahlreicher Forscher hervorgeht. Als Beispiel seien diejenigen Hammarstens genannt, der fand, daß im Kaninchenblutserum die Menge des Globulins sich zu der des Serumalbumins verhält wie 1:2,5, während Menschenblutserum ein Verhältnis von 1:1,51 zeigt. Untersuchungen von Halliburton, May, Wolfenden, Wallerstein und Joachim an den verschiedensten normalen Tieren bestätigten die Verschiedenheiten in der Eiweißzusammensetzung des Blutserums. Die beiden letztgenannten Autoren haben auch das Eu- und Pseudoglobulin Hofmeisters getrennt untersucht und Unterschiede in der Quantität dieser Fraktionen bei verschiedenen Tierspezies gefunden. Noch komplizierter erscheinen die Verhältnisse bei Durchsicht der Angaben, die sich auf die Veränderung des Globulingehaltes bei pathologischen Zuständen beziehen; auch erwachsen der Beurteilung durch die verschiedenartige Methodik, die zur Anwendung gelangte, besondere Schwierigkeiten. Uns interessieren insbesondere die mitgeteilten Veränderungen des Eiweißquotienten und des Gesamteiweißgehaltes bei infektiösen Prozessen bzw. bei Immunisierung.

Becquerel und Rodier fanden eine Verminderung des Gesamteiweißgehaltes beim Kindbettfieber. Halliburton beobachtete eine Vermehrung des Globulins bei akuten Entzündungen wie Pneumonie, Pleuritis, Gelenkrheumatismus und Erysipel. Mya und Viglezio fassen ihre Erfahrungen in dem allgemein

gehaltenen Satz zusammen, daß das Verhältnis der Eiweißkörper im Blutserum bei Krankheiten sich hochgradig ändere, so zwar, daß das Globulin zu- und das Albumin abnähme.

Großes Aufsehen erregten die Angaben von Emmerich und Tsuboi auf dem Kongreß für innere Medizin im Jahre 1892, dahin lautend, daß der Globulingehalt des Blutes von Tieren durch Immunisierung gegen Schweinerotlauf äußerst niedrig werde und daß die Abnahme an Globulin gerade proportional sei der zunehmenden Immunität; das Serum komplett immunisierter Tiere sei nahezu globulinfrei. Das Serumalbumin soll nach ihren Angaben bei Immunität gegen Schweinerotlauf stark vermehrt sein, und ähnliche Verhältnisse sollen bei Tieren herrschen, die gegen den Diplococcus Pneumoniae immunisiert werden. Sie sagen darüber: „Das ist ein gesetzmäßiges Verhalten für eine sehr wichtige Tatsache, welche für alle Zukunft eine Grundlage der wissenschaftlichen Therapie sein wird.“ Von Limbeck und F. Pick machten ein Jahr später genaue Angaben über das quantitative Verhalten der Bluteiweißkörper im Blutserum von Kranken auf Grund mit exakter Methode ausgeführter Versuche. Sie fanden im Serum eine Abnahme des Gesamteiweißgehaltes auch bei denjenigen akuten Infektionskrankheiten, die nicht mit Exsudation einhergehen, und zwar meist bedingt durch eine Abnahme des Albumins, während sich die Menge des Globulins meist innerhalb normaler Grenzen hielt. Die Angaben Halliburtons konnten sie nicht in allen Fällen bestätigen, und die Resultate von Emmerich und Tsuboi glauben sie durch die normalerweise stark schwankenden Globulinwerte von Kaninchen erklären zu können. Von Jaksch kommt auf Grund zahlreicher vergleichender Untersuchungen des Eiweißgehaltes des Gesamtblutes und des Blutserums zu dem Schluß, „daß es eine Eigenschaft des erkrankten Blutes zu sein scheine, daß der Wert für den Eiweißgehalt des Serums sich in viel geringerem Maße ändere als der des Gesamtblutes“.

Es mögen noch die Angaben Platz finden, die sich auf durch Immunisierung gegen Diphtherie bedingte Veränderungen der quantitativen Verhältnisse in den Eiweißkörpern des Serums beziehen. Seng, der feststellte, daß das Antitoxin sich im löslichen Globulin findet, kam zu keiner bestimmten Anschauung über das Verhältnis der einzelnen Eiweißkörper im Immunserum, und bezeichnete es als notwendig, Untersuchungen der Tiere vor, während und nach der Immunisierung vorzunehmen. Dieses Postulat wurde von Joachim erfüllt, der Blutsera eines Pferdes vor und

nach der Immunisierung mit Diphtheritoxin untersuchte. Er fand nach der Immunisierung den Gesamteiweißgehalt nur unwesentlich höher (Szontagh und Wellmann hatten angegeben, daß das Diphtherieserum einen höheren Eiweißgehalt als das normale zeige). Wichtig ist der Befund Joachims, demzufolge im Diphtherieserum das Gesamtglobulin auf Kosten des Albumins beträchtlich vermehrt ist.

Unsere Untersuchungen an Normaltieren zeigen, daß das Verhältnis vom Gesamtglobulin zum Albumin zwischen 1:2 bis 1:3 schwankt. Das Verhältnis von Serumglobulin zu Albumin schwankt zwischen 1:2,32 bis 1:3,59, Werte, wie sie den von Hammarsten ermittelten nahe stehen. Die von v. Limbeck und Pick gemachte Angabe, daß die Globulinwerte bei Kaninchen normalerweise stark schwanken, trifft daher in gewissem Sinne zu, doch ist es für die Beurteilung der durch die Infektion gesetzten Veränderungen wichtig, daß normalerweise ein Sinken des Quotienten unter 1:2 nicht beobachtet wurde.

Von den infizierten Tieren zeigte das Dysenterietier weder eine Veränderung in den absoluten Eiweißwerten, noch auch eine Abweichung des Eiweißquotienten von der Norm. Vom Choleratier mag nur eine geringe Zunahme des Gesamteiweißes mit Rücksicht auf eine Angabe von C. Schmidt, daß bei Cholera der Eiweißgehalt des Blutserums stark erhöht ist, Erwähnung finden. Die Angaben von Emmerich und Tsuboi, daß die gegen Schweinerotlauf immunisierten Tiere eine Abnahme des Globulins und eine Zunahme des Albumins zeigen, konnten wir nicht bestätigen.

Man wird wohl nicht fehlgehen, wenn man als Ursache der auffallenden Resultate der genannten Forscher ihre Methodik ansieht; denn durch Einleiten von Kohlensäure in Serum fällt nur der kleinste Teil des Globulins aus, und auch diese Menge wechselt aus nicht übersehbaren Ursachen. Da der in Lösung gebliebene Teil des Globulins jedoch bei Bestimmung des Serumalbumins durch Alkoholfällung sich zu diesem addiert, finden die von den unsrigen abweichenden Resultate Emmerichs und Tsubois wohl ihre Erklärung, denn wir hätten bei unseren Versuchen zumindest eine Abnahme des Globulins konstatieren müssen, wenn auch unsere Versuchstiere nicht so hohe Immunitätswerte erreichten, wie die der genannten Forscher.

In unseren Versuchen erfuhr im Gegensatz zu Emmerich und Tsuboi das Gesamtglobulin eine Vermehrung, und das Albumin nahm an Menge ab. In zwei unter drei Fällen wurde ein Sinken des Eiweißquotienten von 1:2 bis 1:0,91 resp. 1:1,09 beobachtet. Diese merkwürdige Beobachtung beschränkte sich nicht allein auf die gegen Schweinerotlauf immunisierten Tiere. Sowohl die Typhus-Immuntiere, als auch die durch Pneumo-

coccen und Streptococcen krank gemachten Tiere zeigen dieses auffallende Verhalten des Eiweißquotienten, das bedingt ist durch eine Zunahme des Globulins manchmal bis auf das doppelte des normalen Wertes und eine sich innerhalb engerer Grenzen bewegende Abnahme des Albumins. Am deutlichsten sind diese Verhältnisse bei den Pneumococcentieren ausgeprägt, wo wir eine Veränderung des Quotienten bis zu 1:0,84 finden.

Was den Gesamteiweißgehalt des Blutes der kranken bzw. immunisierten Tiere betrifft, so sehen wir bei fast allen eine geringere oder stärkere Steigerung desselben. Dieses Verhalten wird aber nur deutlich, wenn man den Gesamteiweißgehalt des Plasmas betrachtet, und man käme zu gänzlich unrichtigen Vorstellungen durch Betrachtung des Serumeiweißes allein. Insbesondere geht das aus den Resultaten der Untersuchung an den Pneumococcentieren hervor, wo der Fibrinogenwert eines Falles den der normalen Globulinwerte erreicht bzw. übersteigt.

Es ist schwer, die große Labilität des Globulins zu erklären und wohl angebracht, die Tatsache einfach zu verzeichnen, ohne die über das Wesen der Immunität bereits ausgesprochenen Hypothesen um eine neue zu vermehren. Immerhin ist aber der Hinweis am Platze, daß auch Joachim bei seinen Untersuchungen an Diphtherieimmunserum ein ähnliches Verhältnis, eine sehr bedeutende Zunahme des Gesamtglobulins, gefunden hat, und daß E. P. Pick zeigen konnte, daß das Diphtherieantitoxin bei fraktionierter Fällung mit Ammonsulfat mit der Pseudoglobulinfraktion ausfalle.

Noch ein paar Worte über den Reststickstoff. In den meisten Fällen haben wir feststellen können, daß die Filtrate vom Gesamteiweiß Biuretreaktion gaben; besonders stark war diese in zwei Fällen von Schweinerotlauf. Daraus geht hervor, daß Albumosen bzw. Peptone fast in sämtlichen Blutarten vorhanden waren, von denen erstere sicher nicht zu den primären Albumosen gehören, da solche nach der Halbsättigung mit Ammonsulfat sich nicht mehr in Lösung befinden. Mit Rücksicht darauf, daß Embden und Knoop sowie der eine von uns das Vorkommen von Albumosen im normalen Blute bewiesen haben, ein genaueres Studium derselben aber bis jetzt nicht erfolgte, ist vorläufig kein Urteil darüber zu gewinnen, inwieweit der Reststickstoff etwa von der Infektion beeinflußt wird.

Wir fassen die Resultate unserer Arbeit in folgende Schlußsätze zusammen:

1. Nur durch die Erforschung der quantitativen Zusammensetzung des Plasmas, nicht aber des Serums

läßt sich ein Urteil über das Verhalten der Bluteiweißkörper unter normalen und pathologischen Verhältnissen gewinnen.

2. Der Fibrinogengehalt des Plasmas schwankt normalerweise. Die größte Vermehrung erfährt er unter dem Einflusse der Pneumococcen- und Streptococceninfektion, während die Resultate bei Impfung mit anderen Infektionserregern nicht eindeutig sind.

3. Der Eiweißquotient sinkt bei normalen Kaninchen nicht unter 1 : 2. Fast sämtliche immunisierten bzw. durch verschiedene Infektionen krank gemachten Tiere zeigen eine Zunahme des Gesamtglobulins und Abnahme des Albumins, sodaß der Quotient selbst bis unter 1 : 1 herabgeht.

4. Der Gesamteiweißgehalt steigt fast in allen Fällen von Infektion.

Versuchsprotokolle über die infizierten Tiere.

I. Typhustiere.

Sämtliche Tiere wurden zunächst mit steigenden Dosen von bei 60° abgetöteten, dann mit lebenden Kulturen von Typhusbazillen subkutan und intravenös behandelt, von denen $^1/_5$ Normalöse die tödliche Dosis für ein Meerschweinchen war. Die angegebenen Agglutinationsgrenzwerte sind makroskopisch nach zweistündigem Aufenthalt bei 37° festgestellt.

Tier I. Behandelt vom 4. April (Gew. 1650 g) bis 3. Mai, wird entblutet am 11. Mai (Gew. 1400 g). Das Serum agglutiniert in Verdünnung von 1 : 8000 Thyphusbazillen komplett.

Tier II. Behandelt vom 22. Mai (Gew. 1370 g) bis 24. Juni, entblutet am 27. Juni (1520 g). Das Serum agglutiniert in Verdünnung von 1 : 4000 Typhusbazillen komplett.

Tier III. Behandelt vom 22. Mai (1720 g) bis 21. Juni, entblutet am 27. Juni (Gew. 1620 g). Serum agglutiniert Typhusbazillen in Verdünnung von 1 : 5000 komplett.

Tier IV. Behandelt am 24. Mai (Gew. 2310 g) mit $^1/_4$ Öse bei 60° abgetöteter Kultur, 25. Mai mit $^1/_2$ Öse bei 60° abgetöteter Kultur, 26. Mai mit $^1/_2$ Öse lebender Kultur; am 27. Mai schwer krank, daher entblutet (Gew. 2200 g).

Tier V. Behandelt vom 2. Juli (1810 g) bis 24. Juli, entblutet am 27. Juli (Gew. 1530 g). Serum agglutiniert in Verdünnung 1 : 2000 Typhusbazillen komplett.

Tier VI. Behandelt vom 29. Juni (Gew. 1750 g) bis 23. Juli, entblutet am 27. Juli (1650 g). Serum agglutiniert in Verdünnung von 1 : 1600 Typhusbazillen komplett.

II. Pneumococcen-Versuche.

Am 21. Juni werden drei Kaninchen von etwa 1500 g mit je 0,5 ccm 24stündiger Pneumococcenbouillonkultur geimpft. Am 22. Juni werden im Blute der drei schwer kranken Tiere zahlreiche Pneumococcen nach-

gewiesen. Versuchstier I wird noch abends, Versuchstier II am anderen Morgen entblutet. Das Kontrolltier stirbt in der Nacht vom 22. auf den 23. Juni.

III. Streptococcen-Versuche.

Benutzt wurden Scharlachstreptococcen, die durch Mäusepassage virulent erhalten waren (von Herrn Dr. Rahtjen in Piorkowskis Laboratorium), von denen 1/10 Öse eine Maus in 24 Stunden tötete. Tier I, am 14. Juli mit einer Öse infiziert, wird am 15. Juli im schwerkranken Zustande entblutet. Tier II wird am 20. Juli mit einer Öse der etwas in der Virulenz gesunkenen Coccen infiziert. Am 21. Juli schwer krank; am 22. Juli werden Streptococcen im Blute nachgewiesen. Die Temperatur ist abends 40,5. Das Tier wird entblutet.

IV. Dysenterie-Versuch.

Das Versuchstier war mit einem Extrakt aus Shiga-Kruseschen Dysenteriebazillen intravenös behandelt worden, das nach einem von Brieger und Mayer (Deutsche med. Wochenschrift 1903, 18) angegebenen Verfahren gewonnen war. Das Blutserum agglutinierte Dysenteriebazillen in Verdünnung von 1:800 bei 37° in zwei Stunden makroskopisch komplett.

V. Cholera-Versuch.

Das Tier war vom 21. Juni bis 10. Juli mit 30 ccm Filtrat einer Lösung intravenös behandelt worden, die durch 48stündige Autolyse einer Choleraagarkultur in physiologischer Kochsalzlösung bei 37° gewonnen war. Am 17. Juli entnommenes Serum agglutinierte Cholerabazillen im Werte von 1:200 komplett, und schützte im Pfeifferschen Versuch ein Meerschweinchen gegen eine volle Öse in der Verdünnung von 1:5000 ccm. Am 20. Juli wurde Blut zur Eiweißbestimmung entnommen.

VI. Schweinerotlauf-Versuche.

Die Tiere wurden mit steigenden Dosen erst bei 60° abgetöteter, dann lebender Kulturen virulenter Schweinerotlaufbazillen behandelt. Die ursprüngliche Kultur verdanken wir der Liebenswürdigkeit des Herrn Professor Ostertag.

Tier I. Behandelt vom 16. April (Gew. 1170 g) bis 13. Mai, erhält zuletzt eine Agarkultur und 1 ccm 24stündiger Rotlaufbouillon, entblutet am 20. Mai (Gew. 1370 g).

Tier II. Behandelt vom 26. Mai (Gew. 1400 g) bis 24. Juni, erhält zuletzt 2 ccm 24stündiger Rotlaufbouillon und eine Agarkultur.

Tier III. Behandelt vom 26. Mai (1520 g) bis 21. Juni (1470 g), entblutet am 24. Juni; erhielt zum Schluß eine ganze Agarkultur.

Literaturverzeichnis.

Andral und Gavarret, Versuch einer pathologischen Hämatologie. Übersetzt von Hasse. Leipzig 1844.

Becquerel und Rodier, Untersuchungen über die Zusammensetzung des Blutes im gesunden und kranken Zustande. Erlangen 1845. Deutsch von Eisenmann.

Berggrün, Archiv für Kinderheilkunde 18.

Bleibtreu, Deutsche med. Wochenschr. Nr. 46, 1893.

Burckhardt, A. E., Beiträge zur Chemie und Physiologie des Blutserums. Arch. f. exp. Patholog. u. Pharm. **16**, 322 (1883).

Embden und Knoop, Über das Verhalten der Albumosen in der Darmwand und das Vorkommen von Albumosen im Blute. Diese Beiträge **3**, 120.

Emmerich und Tsuboi, Verhandlungen des Kongresses für innere Medizin 1892.

Halliburton, Lehrbuch d. chem. Physiol. 1893.

Hammarsten, Über das Paraglobulin, Pflügers Archiv **17**, 413. — Lehrbuch d. physiol. Chem. II. Aufl. — Ergebnisse der Physiologie. I. Jahrg.

Heubner, W., Die Spaltung des Fibrinogens bei der Fibringerinnung. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 1903.

v. Jaksch, Über die Zusammensetzung des Blutes gesunder und kranker Menschen. Zeitschr. f. klin. Medizin **23**, 187 (1893).

Joachim, I., Über die Eiweißverteilung in menschlichen und tierischen Körperflüssigkeiten. Wiener klin. Wochenschr. **21**, 1902. Archiv f. d. ges. Physiol. **93**, 558.

Kossler und Pfeiffer, Centralbl. f. innere Medizin **1**, 1896.

Krehl, Pathol. Physiologie 1898.

Lackschewitz, Dissertation. Dorpat 1892.

Langstein, Über das Vorkommen von Albumosen im Blute. Diese Beiträge **3**, 373 (1902).

v. Limbeck und F. Pick, Über die quantitativen Verhältnisse der Eiweißkörper im Blutserum von Kranken. Prag. — Med. Wochenschr. 1893. — Deutsche med. Wochenschr. 1894.

May, zitiert nach Halliburton.

Mya und Viglezio, Arch. ital. di clin. med. **27**, 1888.

Pfeiffer, Th., Über den Fibringehalt des normalen Blutes usw. Zeitschr. f. klin. Medizin **33**, 215.

Pick, E. P., Diese Beiträge **1**, 351 u. ff.

Pohl, J., Ein neues Verfahren zur Bestimmung des Globulins im Harn und in serösen Flüssigkeiten. Archiv f. exp. Pathol. u. Pharm. **20**, 426.

Reye, Über Nachweis und Bestimmung des Fibrinogens. Diss. Straßburg 1898.

Schmidt, C., Charakteristik der epid. Cholera gegenüber verwandten Transsudationsprozessen. Leipzig 1860.

Seng, W., Über die qualitativen und quantitativen Verhältnisse der Eiweißkörper im Diphtherieheilserum. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankheiten **31**, 513.

Simon, zitiert nach Wunderlich.

Szontagh und Wellmann, Vergl. Untersuchungen von normalem und Diphtherieheilserum. Magyar. Orv. Arch. 327 (1898).

Wallerstein, Quantitative Bestimmungen der Globuline im Blutserum und in tierischen Flüssigkeiten. Diss. Straßburg 1902.

Wolfenden, zitiert nach Halliburton.

Wunderlich, Versuch einer patholog. Physiologie des Blutes. Stuttgart 1845.

VI.

Die Indolbildung beim hungernden Kaninchen.

Von Dr. **Fritz Rosenfeld.**

Aus dem Laboratorium der I. medizinischen Klinik zu Berlin.
Dir.: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. von Leyden.

I.

F. Blumenthal und ich*) haben behauptet, daß beim Hungerkaninchen im Harn Indikan erscheint, ohne daß im Darm Indol nachweisbar ist.

Wir hatten damals bei vier Kaninchen, welche zwei bis neun Tage gehungert hatten, den Darminhalt sowohl bei neutraler, wie bei saurer Reaktion destilliert und am Destillat die Cholerarotreaktion in der Weise angestellt, daß genau 10 ccm des Destillats mit 1 ccm einer 0,02proz. frischen Natriumnitritlösung versetzt und dann mit konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet wurden. Dabei zeigte sich, daß der Darminhalt kein Indol enthielt.

Als nun Ende April 1903 von A. Schmidt**), im Anschluß an eine Anregung Paul Ehrlichs***), eine neue Methode veröffentlicht wurde, um Indol in den Fäces nachzuweisen, hielt ich es, angesichts der biochemischen Wichtigkeit der von uns behandelten Fragen für nützlich, die oben erwähnten Versuche mit Hilfe des neuen Reagens noch einmal zu prüfen, zumal von Scholz und Ellinger die Richtigkeit unserer Ergebnisse in Zweifel gezogen worden war.

Ehrlich hatte festgestellt, daß der Dimethylamidobenzaldehyd mit den Fäces eine schöne Rotfärbung gibt, wenn man einen Alkoholauszug der Fäces mit rauchender Salzsäure und etwas Reagens schüttelt. Diese Rotfärbung beweist in den Fäces Anwesenheit von Indol.

---

*) Charitéannalen, Jahrgang 27.

**) A. Schmidt, Münch. med. Wochenschr. April 1903.

***) Ehrlich, Die med. Woche, April 1901.

Ich habe die Probe mit einer ganz geringen Änderung so benutzt, wie sie von A. Schmidt und Baumstark*) ausgearbeitet ist.

Von dem sauber ausgespülten Kaninchenkot werden je nach der Konsistenz 10 bis 20 ccm mit 40 ccm absolutem Alkohol (99,8 proz.) verrieben und dann filtriert. Zu 10 ccm des Filtrats wird nun 1 ccm der Lösung des Reagens (1 Teil Dimethylamidobenzaldehyd: 20 Teilen Alkohol) zugesetzt. Dann wird etwa zehn Minuten geschüttelt und in dieser Zeit tropfenweise konzentrierte rauchende Salzsäure bis zum Eintritt der Rotfärbung (aber höchstens 1 ccm) zugesetzt.

Schon der rötliche Farbenton beweist die Anwesenheit von Indol. Spektroskopisch erkennt man den Indolfarbstoff an einem breiten Absorptionsstreifen rechts von D. Der Farbstoff geht leicht in Chloroform und Amylalkohol über. Man kann dieses Verfahren auch zu einer annähernden quantitativen Bestimmung benutzen, indem man 1 ccm der Probe solange mit Alkohol verdünnt, bis der Absorptionsstreifen eben noch sichtbar ist.

Es ist klar, daß man diese Probe auf Indol auch am Destillat jeder indolhaltigen Flüssigkeit anstellen kann. Man versetzt 10 ccm des Destillats mit 1 ccm Reagens und verfährt wie oben.

Ich habe nun meine Untersuchungen, die sich auf den Indolgehalt der Fäces von normal ernährten und von hungernden Kaninchen erstreckten, folgendermaßen angestellt:

Sofort nachdem das Tier getötet worden war, wurde der Darm abgebunden und herausgenommen. Dann wurde er geöffnet und der Darminhalt mit einem Löffel in eine Schale getan. Der der Innenfläche des Darmes anhaftende Kot wurde mit Wasser abgespült und zwar so, daß Kotbrei und Waschwasser zusammen nicht mehr als 200, höchstens 300 ccm betrugen.

Hiervon wurden untersucht 10 ccm der frischen Fäces mit der Dimethylamidobenzaldehydreaktion. Dieselbe Reaktion wurde auch in dem Destillat der restierenden Fäcesmenge angestellt und zwar sowohl am nativen Destillat wie am Rückstand des mit Äther ausgeschüttelten Destillats. Ebenso wurden die Cholerarotreaktion und die Legalsche Probe angestellt, zum Teil am nativen Destillat, zum Teil am Ätherrückstand.

Es ist klar, daß nicht in jedem einzelnen Falle alle diese Proben zur Anwendung kommen konnten. Ich arbeitete deshalb zuerst mit einer reinen Indollösung**), um die Empfindlichkeit der Reaktion kennen zu lernen.

Es ergab sich nun, daß die Legalsche Probe bei einer Verdünnung von 1:100000 ganz versagte, es sei denn, daß man eine grüne Färbung als den Eintritt der Reaktion ansehen will, was wohl aber nicht gestattet ist. Die Nitrosoindolreaktion ist noch bei 1:200000 zu erkennen; doch gelingt sie nur mit

*) Baumstark, Münch. med. Wochenschr., April 1903. — Archiv für Verdauungskrankheiten 1903. — Schmidt, l. c.

**) Das Indol war von Kahlbaum bezogen.

einer ganz frischen Lösung von Natriumnitrit. Die Probe, ausgeführt mit dem bei 37 bis 40° getrockneten Ätherrückstand, wird nicht viel deutlicher als die am nativen Destillat angestellte.

In der letzten Zeit habe ich noch eine Modifikation der Nitrosoindolreaktion gefunden, durch die es gelingt, das Indol noch in Verdünnungen von 1:1000000 bis zu 1:1200000 (nicht aber mehr von 1:5000000) sicher nachzuweisen.

Schüttelt man die in gewöhnlicher Weise angestellte Probe, nachdem man sie hat abkühlen lassen, mit Amylalkohol aus, so geht der rote Farbstoff sehr leicht in Amylalkohol über und die Reaktion wird dadurch auch noch in den Fällen erkennbar, wo die auf dem gewöhnlichen Wege angestellte Reaktion zu keinem positiven Resultate führt. Ein Absorptionsstreifen ist bei dieser Verdünnung im Amylalkohol nicht zu erkennen.

Empfindlicher als die Nitrosoindolreaktion in ihrer ursprünglichen Form ist jedenfalls die Ehrlichsche Reaktion; denn hier bekommt man noch bei einer Verdünnung von 1:400000 bis 1:500000 eine zwar schwache, aber deutliche Rotfärbung, sowie den charakteristischen, wenngleich sehr schmalen Streifen im Spektrum.

Eine zweite Reihe meiner Versuche galt der Frage, welche Mengen von Indol, die man den Fäces zusetzt, später wieder nachgewiesen werden können.

Zuerst setzte ich zu 200 ccm Fäces + Spülwasser 4 mg Indol, gelöst in 200 ccm Wasser. Die ersten drei Destillate, zusammen 120 ccm, gaben die Probe außerordentlich deutlich.

In dem zweiten Versuche setzte ich zu der gleichen Menge Fäces + Spülwasser 2 mg Indol. Auch bei dieser Verdünnung war die Reaktion noch überzeugend.

Die unterste Grenze für den Nachweis von den Fäces zugesetztem Indol liegt bei 0,05 mg, zugefügt zu 200 ccm Kot + Wasser. Die Nitrosoindolreaktion ist bei dieser Verdünnung aber nicht nur in den ersten 10 ccm des Destillats deutlich, sondern auch in den zweiten und dritten.

Eine dritte Reihe von Versuchen bezog sich darauf, in welchem Maße man das den Organen zugesetzte Indol wieder nachweisen kann. Wir wurden dazu veranlaßt durch eine Bemerkung Paul Mayers*). Dieser Autor schreibt nämlich: „Ein stringenter Beweis für die Entstehung des Indols aus Körpereiweiß scheint mir bis jetzt überhaupt nicht erbracht, da der Nachweis für Indol in den Muskeln und Organen hungernder Kaninchen bis heute nicht gelungen ist."

Wir haben, um das Indol in den Organen nachzuweisen, zwei Methoden angewandt, einmal die Destillationsmethode, sodann jene, deren sich auch Friedrich Müller**) bedient hat.

---

*) Zeitschrift f. klin. Medizin 47, Heft 1 u. 2.

**) Mitteilungen aus der Würzburger Klinik 2, 1886.

Die Organe werden zerkleinert und, mit Alkohol übergossen, 24 Stunden stehen gelassen. Der Alkohol wird verdunstet, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und nach Ansäuern mittels Schwefelsäure mit Äther ausgeschüttelt. Der Äther wird verdunsten gelassen, der Ätherrückstand in wenig Wasser aufgenommen und mit dieser Lösung die Cholerarotreaktion angestellt.

Das Resultat einer Reihe von Versuchen war, daß selbst 2 mg Indol, welche ich dem Leberbrei zugesetzt und tüchtig mit ihm verrieben hatte, durch keine der beiden Methoden nachgewiesen werden konnten.

Wir befinden uns in dieser Frage in völliger Übereinstimmung mit C. A. Herter und A. J. Wakemann*). Auch diesen Forschern gelang es, nach dem Zusammenbringen von Organbrei mit Indollösungen durch Destillation nicht mehr die angewandten Substanzmengen zurückzuerhalten. Die Verfasser vermuten eine lockere Bindung von Indol durch das Körpergewebe. Vergiftet man den Organismus mit Chloroform usw., so wird weit weniger Indol durch die Körperzellen gebunden.

Es geht also aus diesem Teile unserer Untersuchungen hervor, daß zu dem Darminhalt zugesetztes Indol sich sehr leicht wiederfinden läßt. Bei einer Verdünnung von 0,05 mg auf 200 g Kot + Wasser läßt sich das Indol noch durch Destillation mit Leichtigkeit nachweisen. Es geht aber ferner daraus hervor, daß sich den Organen zugesetztes Indol in den für die Vorgänge im Tierkörper in Betracht kommenden Mengen nicht nachweisen läßt.

Damit entfällt der Vorwurf, daß wir verpflichtet gewesen wären, das Indol in den Organen und Muskeln nachzuweisen, ehe wir von einer Indolentstehung aus Körpereiweiß hätten sprechen dürfen.

Nachstehend gebe ich die Resultate meiner Untersuchungen in Form einer Tabelle wieder, weil diese deutlich genug für sich spricht, schicke aber noch einige Bemerkungen voran.

In einigen Fällen habe ich das Harnindikan quantitativ bestimmt und zwar nach der Methode von Strauß**). Dieselbe ist, wie die von Ellinger***) angegebene, eine Modifikation der Wangschen Methode. Beide Methoden sind vorzüglich verwendbar bei Zusatz von reiner Indigotinlösung zu irgend einer Flüssigkeit; bei der Bestimmung des Indikans im Harn haben beide Methoden eine ähnliche Fehlerquelle. Das zugesetzte Chloroform färbt sich oft nichts weniger als blau, sodaß es schwer

*) Malys Jahresbericht 1899, S. 395.
**) Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 15.
***) Zeitschr. für physiol. Chemie 38.

hält, den richtigen Moment des Farbenumschlags resp. des Vergleiches beim Titrieren mit dem Reagens nicht zu verpassen.

In einem Teil meiner Versuche an hungernden, d. h. nur bei Wasser gehaltenen Tieren habe ich gleichzeitig neben dem Harnindikan auch den Harnstickstoff bestimmt, um für die große Differenz in der Indikanmenge der verschiedenen Tage eine Erklärung zu finden.

Aus meinen Untersuchungen läßt sich erkennen, daß Stickstoffzerfall und Ausscheidung von Indikan nicht Hand in Hand gehen. Doch läßt sich diese Tatsache meines Erachtens nicht dagegen anführen, daß das Indikan in diesen Fällen aus dem Körpereiweiß herrühre.

Wie beim schweren Diabetiker oder beim pankreaslosen Hund der Eiweißstickstoff nur zum Teil ausgeschieden, zum anderen Teil aber zurückgehalten und zum Aufbau, ja sogar wieder zum Stickstoffansatz verwandt wird, während der zuckerbildende Komplex des Eiweißmoleküls zur Ausscheidung kommt (Umber, Blumenthal), so wird anscheinend beim hungernden Tier die aromatische Gruppe des Eiweißmoleküls, die sich ja auch im Reagenzglasversuch leicht abspalten läßt, zuerst ausgeschieden, während der Kernstickstoff teilweise zum Bestand des Körpers verwandt wird. In den letzten Tagen des Lebens, wenn die prämortale Stickstoffsteigerung eintritt, ist dann die aromatische Gruppe in geringerem Maße oder überhaupt nicht mehr im Eiweißmolekül enthalten. Daher kann in den letzten Lebenstagen die Indikanurie schwächer werden oder gar aufhören, wenn nicht das Kaninchen in den ersten Tagen des Hungerns zum Teil aus Gründen, die nicht mit der Inanition zusammenhängen, zugrunde gegangen ist. Daher rühren wohl auch die mit unseren früheren Angaben in Widerspruch stehenden Beobachtungen von Ortweiler*).

Außer diesen hier mitgeteilten Versuchen verfüge ich noch über 12 andere. Unter diesen 12 befinden sich 4, welche Herr Dr. phil. Hans Wolff im Laboratorium der Abteilung für Krebsforschung angestellt hat. Ich habe diese 12 Versuche deswegen hier nicht ausführlich in die Tabelle aufgenommen, da dieselben, mit Ausnahme eines Versuches von Herrn Wolff, alle eindeutig verliefen. Trotzdem wir die Bedingungen in der mannigfachsten Weise variierten, vom normal ernährten und unterernährten Kaninchen einerseits, bis zum Kaninchen, welches 12 Tage gehungert hatte, alle ergaben, mit Ausnahme von 5 Versuchen, also im

*) Untersuchungen aus der Würzb. mediz. Klinik 2, 1886.

Versuch Datum / Nr.	18.5.03 / I.	27. 5. / II.	29. 5. / III.	3. 6. / IV.	5. 6. / V.	10. 6. / VI.	14. 6. / VII.	17. 6. / VIII.
Normal ernährtes Kaninchen	normal		normal			normal	normal	normal
Hungerkaninchen, seit wie lange		hungert seit 5 Tagen		seit 5 Tagen	seit 7 Tagen			
Harnindikan	–	++	+	++	+++	–	+	–
Fäces, Cholerarotreaktion aus nativem Destillat	–	nicht angestellt	Geruch	Geruch	Geruch	–	–	–
Fäces, Cholerarotreaktion nach Ätherausschüttelung								
Fäces, Ehrlichsche Reaktion	–	+ 0,06 mg Indol	0,015 mg Indol	0,045 mg Indol	0,225 mg Indol	–	–	–
Fäces, Ehrlichsche Reaktion am Destillat								–
Tryptophan-Reaktion an den Fäces								
Phenol aus dem Destillat der Fäces								
Leber		–		–				
Darmschleimhaut		Spur		–				
Nieren		–		–				
Muskeln		–		–				
Blut				–				

ganzen 27 neu angestellte Versuche, daß im Darm des hungernden Kaninchens kein Indol enthalten ist.

Ellinger hat unter seinen vier Tieren bei dreien eine deutliche positive Reaktion auf Indol erhalten, während es Blumenthal und mir in unsern früher publizierten vier Fällen nicht gelungen war, Indol im Darminhalt des hungernden Tieres nachzuweisen. Ellinger führt nun unsern negativen Befund darauf zurück, daß wir es unterlassen hätten, das Destillat des Kotes mit Äther auszuschütteln und am Ätherrückstand die Reaktion anzustellen.

Auf die Verhältnisse des Indolnachweises im Darm übt nun die Ausschüttelung mit Äther nach meinen Untersuchungen keinen nennenswerten Einfluß aus. Ist überhaupt Indol vorhanden, dann geht es ins Destillat über. Die in allen Fällen ausgeführten Kontrollversuche mit der Ehrlichschen Reaktion, die bei reinen Indollösungen noch in einer Verdünnung von 1:500000 einen

9. 6. IX.	20. 6. X.	23. 6. XI.	27. 6. XII.	27. 6. XIII.	30. 6. XIV.	2. 7. XV.	4. 7. XVI.	11. 7. XVII.	14. 7. XVIII.	17. 7. XIX.	23. 7. XX.
*)					4 Tage mit Hafer gefütt.	6 Tage mit Hafer gefütt.			**)	***)	
seit [illegible] Tagen	seit 7 Tagen	seit 4 Tagen	seit 8 Tagen	seit 4 Tagen			8 Tage gehungert	8 Tage stirbt von selbst	seit 5 Tagen	seit 6 Tagen	seit 6 Tagen
+	++	+++	+++	++	++	+	++	—	7,85 mg	10 mg	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		—	—	—				—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—		—					—
	—	—	—	—	—	—	—	—			
			—	—	+	+	++				—
				—	—	—					—
				—	—	—					—
					—	—					
				—	—	—					—
				—	—	—					

*) Von diesem Versuch ab immer mit Kontrollversuchen an Indol-Lösungen.
**) Nach der Methode von Legal dieselben Resultate.
***) Wie bei Versuch XVIII.

deutlichen Streifen im Spektrum ergibt, lehrten, daß auch bei Anwendung dieser Probe die Destillate sich ebenso verhielten wie die Ätherextrakte.

Ich bin daher wohl berechtigt, den Schluß zu ziehen, daß von meinen 36 Kaninchen*) 31 in allen Stadien der Ernährung und des Hungers Indol im Darminhalt vermissen ließen und nur 5 geringe Mengen von Indol im Darminhalt aufwiesen.

Was der Grund war, daß wir in fünf Versuchen eine positive Indolreaktion in den Fäces erhielten (in einem Falle nach Ehrlich 0,2 mg Indol in 20 g des Ausgangsmaterials) vermag ich für meine Versuche mit Bestimmtheit nicht anzugeben. Es ist ja möglich, daß dieser Befund mit

*) Die Untersuchungen der früheren Arbeit sind hier mitverwertet.

der hohen Lufttemperatur, die gerade damals herrschte, zusammenhängt. Auf etwaige Blutungen oder Eiterungen habe ich versäumt zu achten.

Der positive Befund von Indol in den drei Versuchen von Ellinger läßt sich vielleicht in folgender Weise erklären.

An Ellingers Versuchen fällt auf, daß seine Tiere, mit Ausnahme eines Versuchs, alle vorher mit Hafer ernährt worden waren, der nach unseren Feststellungen, sowie nach denen von Scholz*) schon an und für sich eine starke Indikanurie erzeugt. Inwieweit diese Fütterung auf die Anwesenheit von Indol im Darminhalt von Einfluß war, läßt sich nicht sicher entscheiden. Unsere mit Kohlrüben gefütterten Tiere hatten, wie gezeigt, in der weitaus überwiegenden Zahl der Fälle kein Indol im Darminhalt.

Es ist in dieser Hinsicht sehr bedauerlich, daß in zwei Fällen Ellingers die Untersuchung des Darminhalts, wo sie vielleicht am beweiskräftigsten gewesen wäre, unterblieb, nämlich bei Tier Nr. 6, das vorher mit Rüben gefüttert worden war, nicht mit Hafer, und bei Tier Nr. 5, das in den beiden letzten Tagen seiner Karenz indikanfrei war.

Ellinger führt die hohe Indikanausscheidung der Hungertiere von Blumenthal und mir darauf zurück, daß unsere Kaninchen ihren Kot ungehindert verzehren konnten. Er nimmt an, daß dieser so immens fäulnisfähige Stoff im Darm der Kaninchen zur Indolbildung geführt habe. Diese Indolbildung erkläre die starke Indikanausscheidung unserer Kaninchen. Daß wir im Darm kein Indol gefunden hätten, liege darin, daß unsere Methodik diese kleinen Mengen Indol nicht nachweisen ließe; abgesehen davon, daß das gebildete Indol hätte eventuell zu rasch resorbiert werden können.

Ich glaube bereits bewiesen zu haben, daß unsere Methodik ausgereicht hätte, um etwaiges Indol nachzuweisen. Ich habe aber auch, um dem Ellingerschen Einwurf direkt zu begegnen, in vier Versuchen sowohl normal ernährte, kein Indikan ausscheidende Kaninchen, als auch Indikan ausscheidende Hungertiere mit dem frischen Darminhalt eines eben getöteten Kaninchens ernährt, indem ich den Tieren je 30 bis 50 ccm mit der Schlundsonde eingab.

In keinem der vier Versuche ließ sich Indol im Darminhalt nachweisen. Die Tiere, welche gut ernährt waren, schieden trotz der Kotfütterung kein Indikan im Harn aus. Es kann also die Indikanurie bei unseren Hungertieren nicht auf das Verzehren des eigenen Kots zurückgeführt werden.

Im übrigen kann es nicht auffallen, daß gelegentlich auch im Kaninchenkot wie in allen faulenden Medien Indol vorkommt. Beweisend in der vorliegenden Frage können nur die Versuche sein, in denen das Indol trotz bestehender Indikanurie im Darminhalt fehlt, wie auch in einem Versuch von Ellinger. Gerade für diese Fälle handelt es sich darum, die Herkunft des Indikans festzustellen.

*) Zeitschr. für physiol. Chemie 38.

Der Einwand Ellingers, daß das Indol aus dem Darm sehr schnell resorbiert wird und sich dem Nachweis daselbst entzieht, steht mit seiner eigenen Beweisführung insofern in Widerspruch, als in seinen Versuchen das Indol nicht so schnell aus dem Darm resorbiert wurde, als daß es nicht hätte nachgewiesen werden können.

Wenn endlich Ellinger aus der Literatur Fälle anführt, wonach bei starker Indikanurie der Darminhalt nur wenig Indol enthielt, so liegt das gerade daran, daß keine Kongruenz zwischen Indikanurie und Darmfäulnis vorhanden ist, was unsere Versuche auch ergeben. Es ist eben zu Unrecht ganz künstlich diese Inkongruenz mit der Lehre von der Indikanbildung in Einklang zu bringen versucht worden und die Ergebnisse von Baumstark und Schmidt zeigen ebenfalls, daß beim Menschen zwischen Indikanurie und Gehalt der Fäces an Indol kein Parallelismus besteht.

II.

In der oben erwähnten Arbeit haben Blumenthal und ich über Versuche von Kaninchen berichtet, die sich in dem von mir so genannten labilen Stickstoffgleichgewicht*) befanden. Bei diesen Kaninchen gelingt es, durch Phlorizininjektion eine Indikanurie hervorzurufen, welche mit einer vermehrten Stickstoffausscheidung einhergeht. Als Paradigma dieser Versuche führe ich hier an:

Versuch 5**).

Kaninchen 1340 g.

Datum	Nahrung	Urinmenge ccm	Stickstoff g	Zucker	Indikan	Bemerkungen
19. März 1902	200 g Kohl	250	0,670	–	negativ	—
20. „ „	„	250	0,720	—	„	—
21. „ „	„	240	1,240	0,5 Proz.	positiv	Gestern 0,3 g Phlorizin
22. „ „	„	220	0,980	0,3 „	„	—
23. „ „	„	210	0,860	—	negativ	—
24. „ „	„	175	0,740	—	„	– –
27. „ „	„	200	0,780	—	„	—
28. „ „	„	225	1,150	0,6 Proz.	positiv	Gestern 0,3 g Phlorizin
29. „ „	„	205	1,050	0,2 „	negativ	—
30. „ „	„	195	0,910	—	„	—

*) Verhandl. der Karlsbader Naturforscher-Versammlung 1902.
**) l. c.

Man erkennt leicht, daß Indikanurie zugleich mit der Vermehrung des ausgeschiedenen Stickstoffs auftritt. Aus der Koinzidenz dieser beiden Faktoren haben wir den Schluß gezogen, daß die Indikanurie in einem ursächlichen Zusammenhange mit dem gesteigerten Eiweißzerfall steht.

Es sind nun einige neue Arbeiten erschienen, die unsere Ansicht bekämpfen. Paul Mayer*) hat bei seinen Phlorizinversuchen niemals einen Einfluß des Phlorizins auf die Indoxylausscheidung beobachtet. Er hat „streng darauf geachtet, daß die Kaninchen ausreichend ernährt werden". Die von ihm angeführten drei Versuche können aber in keiner Hinsicht als Widerlegung unserer Angaben gelten. Er hat unterlassen, den durch das Phlorizin gesetzten Eiweißzerfall an der Hand von Stickstoffbestimmungen zu kontrollieren, und so beweisen seine Versuche neuerdings, was Blumenthal**) längst gezeigt hat, daß nämlich Phlorizin bei ausreichend ernährten Tieren keine Indikanurie hervorruft, was auch mit den Ergebnissen von Merings***) über die Wirkung des Phlorizins auf den Eiweißzerfall im Einklang steht. Der von Mayer ausgesprochene Gegensatz in unsern Versuchsergebnissen und den seinigen existiert eben gar nicht.

H. Scholz†), ein Schüler Ellingers, hat in einer Arbeit die Versuche von Harnack und von der Leyen††), sowie von Carl Lewin†††), Blumenthal und mir einer Nachprüfung unterzogen. Für uns kommen von seinen Versuchen nur Versuch 7 bis 9 in Betracht.

Allen drei Versuchen ist gemeinsam, daß der entscheidende Punkt, auf den wir immer wieder hingewiesen haben, nicht beachtet wird. Auch Scholz hat keine Stickstoffbestimmungen ausgeführt.

Es läßt sich nicht ersehen, auf welche Weise Scholz sonst erkennen will, daß ein gesteigerter Eiweißzerfall eingetreten ist.

Im Versuch 7 von Scholz blieb das Tier fünf Tage lang auf dem Gewicht von 2470 bis 2420 g (am 26. Mai 1902). An diesem Tage erhielt es 0,75 g Phlorizin, am 27. 5. schied es 1,5 Proz. Zucker aus und sein Körpergewicht hob sich um 210 g. Natürlich trat keine Indikanvermehrung ein.

*) Diese Beiträge 2, 17.
**) Verhandlungen der Berl. physiol. Gesellschaft 1902.
***) Zeitschr. für klin. Medizin 14, 16.
†) Vgl. Zeitschr. f. physiol. Chemie 38.
††) Zeitschr. f. physiol. Chemie 29.
†††) Diese Beiträge 1, 472.

In Versuch 8 wog das Kaninchen am 21. V. 2915 g, am 22. V. 2820 g, am 23. V. 2835 g, am 24. V. 2710 g, am 25. V. 2650 g, am 26. V. 2680 g.

An diesem Tage bekam das Tier subkutan 0,7 g Phlorizin. Am 27. V. schied das Tier 1,4 Proz. Zucker aus und wog 3000 g, also eine Zunahme von 320 g gegenüber dem Tag zuvor!

In Versuch 9 wog das Tier in der Vorperiode durchschnittlich 2210 g und schied 2,0 mg Indigo aus. In der Hauptperiode wog das Tier 2140 g und schied 2.5 mg aus. Scholz hat dann ferner noch zwei Versuche an Hungertieren veröffentlicht, denen er Phlorizin injiziert hat. Ich glaube eine Erklärung dafür bereits gegeben zu haben, daß die Indikanausscheidung bis zum Tode nicht stetig zunimmt. Interessant ist immerhin für uns, daß das Indikan auf Phlorizininjektion von 3,6 mg auf 13,6 mg hinaufgeschnellt ist. Die Indikanurie sank dann später wieder ab.

Scholz hat übrigens ganz recht, wenn er glaubt seinen hohen Indikanwert am ersten Tag (28,2) auf die vorher gegangene Haferfütterung zurückführen zu sollen. Haferfütterung scheint uns aus diesem Grunde überhaupt für die Anstellung solcher Versuche ungeeignet zu sein.

Dem Verlangen von Scholz und Ellinger, wir hätten quantitative Indikanbestimmungen zur Entscheidung der Frage machen müssen, konnte schon deshalb nicht entsprochen werden, da, wie aus unsern Protokollen*) zu entnehmen ist, unsere Tiere in der Vor- und Nachperiode überhaupt kein Indikan ausgeschieden haben.

III.

In unserer gemeinsamen Arbeit haben Blumenthal und ich die Frage nach der Quelle des Indoxyls in unseren Versuchen aufgeworfen. Wir hatten damals an das „Tryptophan oder einen ähnlichen Körper“ gedacht.

Ich hatte bereits im November 1902 nach Abschluß unserer Arbeit einige Versuche angestellt, die unserer damaligen Annahme von der Herkunft des Indoxyls eine bessere Stütze verleihen sollten.

Etwa ein Jahr vorher hatten wir Rinderpankreas unter Zusatz von reichlichen Mengen Chloroformwassers der Autolyse ausgesetzt. Nach längerer Zeit war die Flüssigkeit sehr stark tryptophanhaltig, so stark, daß 1 ccm der Flüssigkeit verdünnt auf 10 ccm mit Bromwasser noch eine ausgesprochene Reaktion gab.

In der ersten Versuchsreihe, die vom 23. XI. bis 6. XII. 1902 durchgeführt wurde, gab ich vier Kaninchen mit der Schlundsonde je 25 ccm dieser Tryptophanflüssigkeit. Von diesen vier Kaninchen schied das erste eine geringe Menge Indikan aus, das zweite, dritte und vierte nicht.

In der zweiten Versuchsreihe, die vom 7. bis 14. XII. dauerte, erhielten drei Kaninchen je 15 ccm dieser Lösung subkutan bzw. intraperitoneal. Auch diese drei Tiere schieden kein Indikan aus.

*) l. c.

Ahnliche Resultate haben vor kurzem Ellinger und Gentzen*) mit reinem Tryptophan erhalten. Ihre Versuche ergaben, daß das Tryptophan weder nach subkutaner Injektion, noch nach Beibringung mit der Schlundsonde Ausscheidung von Indikan veranlaßte.

Ich habe dann zu wiederholten Malen, an den Organen sowohl wie an den Fäces meiner Hungertiere die Tryptophanreaktion angestellt, die aber in keinem Falle positiv ausfiel.

In zwei weiteren Versuchsreihen habe ich zu den Organen hungernder, wie zu denen normal ernährter Tiere je 100 ccm dieser Tryptophanlösung zugesetzt und diese Mischung 14 Tage bis 4 Wochen lang einer antiseptischen Autolyse unterworfen. Die Organe waren: Leber, Niere, Darmschleimhaut und Muskeln, in einem Falle auch Gehirn und Rückenmark. Ich habe nach dieser Zeit die Autolyse abgebrochen und die Flüssigkeit auf Indol und auf Indikan untersucht, aber immer ohne Erfolg.

Nach all diesen Versuchen halte ich es in Übereinstimmung mit Ellinger nicht mehr für wahrscheinlich, daß das Indol beim Abbau von Eiweißkörpern im Organismus des Kaninchens durch die Zwischenstufe des Tryptophans entsteht, während die Bildung von Indol aus Tryptophan durch Bakterieneinwirkung auf Grund der Versuche von Hopkins außer Zweifel steht.

Die Arbeit ist mit Hilfe der Gräfin Bose-Stiftung angefertigt.

*) Diese Beiträge 4, 171.

VII.

Über spezifische Erythrolyse.

Von **Clarence Quinan.**

Aus dem Hearst Laboratory of Pathology, University of California.

Vom morphologischen Standpunkt aus betrachtet, wird die Erythrolyse als ein Zellzerfall angesehen, der durch die Wirkung eines fremden Serums bedingt ist. Der Ausdruck „spezifische Erythrolyse“ wird in engerem Sinne gebraucht, um jene Lösung von roten Blutkörperchen zu bezeichnen, die durch das Serum eines mit den betreffenden Blutkörperchen behandelten Tieres erzielt wird. Es sind also für diese Reaktion Blutkörperchen und Serum verschiedenen Ursprungs erforderlich.

Serum ist nun eine Flüssigkeit, welche eine große Zahl von Substanzen enthält: Elektrolyte, Eiweißkörper, andere organische Substanzen, sogenannte Extraktivstoffe. Der Bau der Eiweißkörper, des Albumins und der Globuline, ist zwar unbekannt, man darf aber auf Grund neuerer Untersuchungen annehmen, daß sie ein sehr großes Molekül besitzen und wohl auch, daß sie in Form von Ionenverbindungen zirkulieren, wenngleich für letztere Annahme ein ganz zwingender Beweis noch nicht erbracht ist. Unter den Bedingungen des Lebens, wo Ausscheidung und Resorption stetig im Gange sind, muß die Zusammensetzung des Serums einem fortwährenden Wechsel unterliegen; aber die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen diesen Prozessen ist so vollkommen, daß die Konzentration des Serums, durch sein spezifisches Gewicht ausgedrückt, stets nur wenig von 1,028 abweicht.

Es ist klar, daß jede spezifische Wirkung des Serums von einer bestimmten Komponente, von verschiedenen bekannten oder unbekannten Serumbestandteilen herrühren kann.

Das rote Blutkörperchen darf bei dem Vorgang der Erythrolyse als Indikator gelten. Es besitzt eine Membran, die eine Lösung

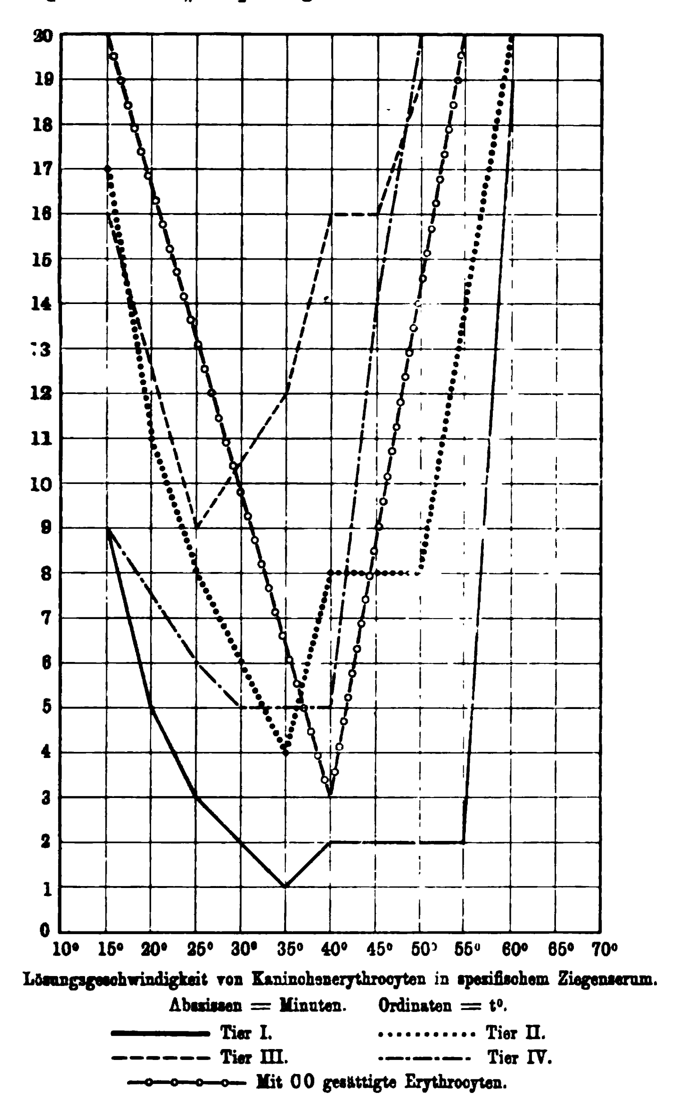
von Eiweißkörpern, hauptsächlich von Hämoglobin, umschließt. Normalerweise diffundieren diese Eiweißstoffe nicht heraus. Bei der Erythrolyse ist nun mit drei Möglichkeiten zu rechnen: 1. kann bei dem spezifischen Auflösungsphänomen die Zellmembran so verändert werden, daß sich Permeabilität einstellt und der Austritt von Zellinhalt möglich wird; 2. das Hämoglobin geht in eine neue Verbindung über und wird auf diese Weise leichter diffundierbar oder 3. durch die Wirkung des spezifischen Serums entsteht plötzlich ein höherer osmotischer Druck innerhalb der Zelle und die Zellmembran reißt. Trotz des Fehlens schlagender Beweise kann man, auf Analogien gestützt, doch wohl nur die erste Möglichkeit ernstlich in Betracht ziehen.

Wird ein Erythrocyt in das spezifische Serum eingebracht, so wird nach einiger Zeit sein Umriß weniger scharf, dann undeutlich und darauf geht das Hämoglobin in die Lösung über. Dies geschieht schon bei gewöhnlicher Temperatur; die Raschheit der Auflösung wird durch Erhöhung der Temperatur bis zu einem Optimum gesteigert, sinkt dann aber bei weiterer Temperatursteigerung schnell ab. Die Erfahrung lehrt ferner, daß die Geschwindigkeit des Phänomens bis zu einem gewissen Grade auch von Zustandsänderungen bedingt ist. Beispielsweise zeigen Erythrocyten, welche in ihrem eigenen Serum vier oder fünf Tage aufbewahrt worden sind, eine höhere Resistenz als frisch entnommene. Überhaupt ist das Verhalten der Zellen starken individuellen Schwankungen unterworfen. Sehr bemerkenswert ist, daß Erythrocyten, deren Hämoglobin eine feste Verbindung mit Kohlenoxyd eingegangen ist, sich von normalen Erythrocyten gar nicht unterscheiden (vgl. nebenstehende Tafel).

Die hämolytische Eigenschaft eines Serums wird bekanntlich durch Temperaturerhöhung vernichtet. Dieser Inaktivierungspunkt wird gewöhnlich als in der Nähe von 56° C gelegen angegeben; nach meinen Erfahrungen mit Ziegenserum aber kann er zwischen 50 und 65° C schwanken (vgl. nebenstehende Tafel). Ein durch Hitze inaktiviertes Serum kann bekanntlich durch Zusatz eines an sich unspezifischen Serums wieder aktiviert werden. Augenscheinlich hat man es mit zwei Eigenschaften zu tun, von denen die eine thermolabil, die andere thermostabil ist.

Durch diese Beschreibung wird die Tatsache der Erythrolyse ausreichend bestimmt; dieses einfache Verhalten birgt aber in sich eine Fülle von Möglichkeiten, denn im Serum können durch die Wirkung mannigfaltiger Reize viele verschiedene spezifische Er-

scheinungen hervorgerufen werden. Für fast jede spezifische Wirkung scheint es möglich, eine „Antiwirkung“ zu erzielen und die Zahl solcher bekannt gewordenen Wirkungen und Gegenwirkungen ist derzeit schon so angewachsen, daß man vor dem Gewirr spezifischer „Körper“ geradezu zurückschreckt.



Lösungsgeschwindigkeit von Kaninchenerythrocyten in spezifischem Ziegenserum.
Abszissen = Minuten. Ordinaten = t°.
——— Tier I. .... Tier II.
------ Tier III. -·-·-·- Tier IV.
—o—o—o—o— Mit CO gesättigte Erythrocyten.

Es ist zu bezweifeln, daß weitere morphologische Studien über Erythrolyse Licht auf das eigentliche Problem werfen werden.

In den letzten Jahren hat die einschlägige Literatur einen enormen Umfang angenommen und ist überreich an Widersprüchen. Der Fülle von experimentellen Tatsachen entsprechend, ist auch die theoretische Betrachtung der Frage mehr in den Vordergrund getreten, und mit ihr eine eigenartige Nomenklatur, die die Eigenschaften morphologischer Objekte chemisch auszudrücken sucht. Daß die große praktische Bedeutung dieser Frage Anregung zu ungemein zahlreichen fleißigen Arbeiten gegeben hat, mag dazu beigetragen haben, daß das Problem mehr ausführlich als gründlich bearbeitet worden ist.

Es ist vor allem wünschenswert, die hämolytische Eigenschaft eines Serums auf bestimmte Bestandteile desselben zurückzuführen. Diese Möglichkeit praktisch zu prüfen, war der Zweck vorliegender Untersuchung. Von diesem Gesichtspunkte aus bedarf es einiger allgemeinen Bemerkungen.

Im allgemeinen scheint die Erythrolyse zu den chemischen Vorgängen zu gehören, bei denen auf anscheinend geringen Anlaß hin große energetische Umsetzungen stattfinden. Zwar ist ohne Zweifel auch die ungleiche osmotische Spannung allein imstande, einen Zellzerfall hervorzubringen, aber dieser Wirkung kommt keine spezifische Natur zu. Auch die Frage: Gibt es zwischen dem Inhalt der roten Blutkörperchen und den Bestandteilen des aktiven Serums eine Reaktion in dem gewöhnlichen Sinne, ist sie durch bestimmte stöchiometrische Verhältnisse ausdrückbar? kann nur verneinend beantwortet werden. Im anderen Falle müßte man begrenzte Massenverhältnisse postulieren, was aber bei unserer jetzigen Kenntnis absolut unmöglich ist.

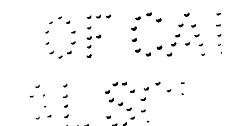
Praktisch kann das Phänomen der Erythrolyse von drei Richtungen aus betrachtet werden: 1. das spezifische Lösungsvermögen ist die Funktion des Moleküls irgend einer Eiweißkomponente des Serums; die Wirkung wäre also nach Art der Katalyse aufzufassen und in diesem Falle wäre die qualitative und quantitative Analyse des Serums durchaus vergeblich. Zweitens, die spezifische Wirkung könnte durch Additivprodukte der Eiweißkörper verursacht sein; in diesem Falle wäre eine molekulare Veränderung eingetreten, welche bei der qualitativen Analyse positive Resultate geben könnte. Oder drittens, die aktiven Eigenschaften könnten an neue Körper unbekannter Natur gebunden sein, in welchem Falle ebenfalls die qualitative Analyse positiv ausfallen könnte.

Die erste Voraussetzung steht in bestem Einklang mit der neueren Entwickelung der physikalischen Chemie, welche eine sehr

große Anzahl von Fällen sichergestellt hat, in denen das Gleichgewicht eines Systems durch die Gegenwart einer kleinen Menge eines Körpers geändert wird, wobei der Katalysator unverändert bleiben kann. Es ist dabei von grundlegender Bedeutung, darüber klar zu sein, daß ein Katalysator niemals als solcher eine Umsetzung hervorruft, sondern nur eine schon langsam verlaufende Reaktion beschleunigt. In dieser Weise werden durch die Anwesenheit einer verschwindend kleinen Menge eines Katalysators sehr tiefgehende und umfangreiche Veränderungen hervorgebracht. Vorgänge, die in der anorganischen wie in der organischen Natur sehr verbreitet sind, und es gibt kein Merkmal, wodurch die Fermentationen von den anorganischen katalytischen Vorgängen sicher unterschieden werden könnten. Bredig[1]) ist zur Ansicht gelangt, daß die kolloidalen Lösungen nicht echte Lösungen, sondern nur äußerst feine Suspensionen sind. Ist dies wirklich der Fall, so liegt die Annahme nahe, daß das Blutserum eine Flüssigkeit ist, welche für die katalytische Wirkung besonders viel Spielraum bietet. Eine wie geringfügige Menge katalytisch wirkender Substanz noch die hydrolytische Spaltung beschleunigt, geht aus der Angabe von O. Sullivan und Tompson[2]) hervor, daß ein Teil Invertase in kurzer Zeit die Inversion von zweihunderttausend Teilen Saccharose zustande bringen kann.

Die zweite und dritte der obenangeführten Fragestellungen grenzen durchaus an das Arbeitsfeld des organischen Chemikers. Praktisch gestaltet sich diese Aufgabe, mit der ich mich beschäftigt habe, zu einer quantitativen Fraktionierung des aktiven Serums und Prüfung jedes Anteils auf spezifische Wirkung.

Es ist klar, daß hier die ganze Frage nach der chemischen Natur der Serumbestandteile berührt werden mußte, ebenso, daß die Untersuchungsmethoden, welche gewöhnlich zur Charakterisierung von Substanzen unbekannter Zusammensetzung gebräuchlich sind, in Anwendung gezogen werden mußten. Ich war mir von Anfang an der technischen Schwierigkeiten der Aufgabe wohl bewußt. Einerseits ist die Chemie des Blutserums noch vielfach dunkel, andererseits aber bestanden zwei Bedenken: 1. war theoretisch anzunehmen, daß, wenn der Ambozeptor etwa spezifisch katalytisch wirkte, er in einer solchen Verdünnung vorhanden sein dürfte, daß er einer Analyse entgehen müßte; und 2. war durch neuere Arbeiten über den kolloidalen Zustand [Hardy[3])] das Vertrauen in die Möglichkeit einer Isolierung verschiedener bestimmter Eiweißkörper oder sogar

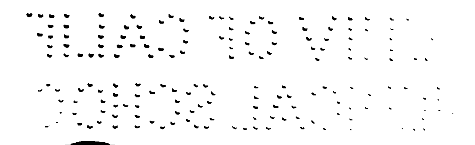


anderer nicht eiweißartiger Körper aus dem Serum schwer erschüttert.

Ich habe nun während der letzten zwei Jahre Untersuchungen von analytischem Standpunkt ausgeführt, in der Hoffnung, die Verteilung bzw. die chemischen Eigenschaften der „spezifischen Körper" festzustellen. Es wurde durchweg ein durch Vorbehandlung aktiviertes Serum benutzt, obwohl es klar war, daß die Resultate sich vielleicht auf normales Serum nicht ausdehnen lassen würden. Das Material stammte von sechs Ziegen, welche regelmäßig Einspritzungen von viel defibriniertem Kaninchenblut erhalten hatten (durchschnittlich jedesmal 100 bis 150 ccm). Das Serum zeigte immer sehr große Wirksamkeit. Nach dem Vorhergesagten war der Zweck der Untersuchung, die verschiedenen Bruchteile des Serums auf ihre spezifische Wirksamkeit zu prüfen. Um dies verfolgen zu können, war augenscheinlich eine genaue Kenntnis der quantitativen Verhältnisse der Serumeiweißstoffe nötig. Da die einschlägigen Angaben in der Literatur mir nicht ganz beweiskräftig schienen, so habe ich die Frage neuerdings experimentell durchgearbeitet. Im Laufe der Arbeit wurden sämtliche Aussalzungsmethoden durchgeprüft und zahlreiche quantitative Analysen ausgeführt. Die Resultate dieser Versuchsreihen waren sehr interessant und in einem Punkte eindeutig. Eine ausführliche Veröffentlichung soll demnächst erscheinen, ich verweise auf eine bereits erschienene vorläufige Mitteilung[4]).

An dieser Stelle sei nur daran erinnert, daß das Serumeiweiß in drei Gruppen von Eiweißstoffen zerfällt: wasserlösliches Globulin, wasserunlösliches Globulin und Albumin. Es ist längst bekannt, daß das Serumglobulin kein einheitlicher Körper ist. Dies erhellt schon daraus, daß, wenn Serum salzfrei dialysiert und dann verdünnt wird, sich viel weniger Globulin ausscheidet als durch Magnesiumsulfat ausgefällt werden kann. Umgekehrt scheidet sich das durch Sättigung mit Magnesiumsulfat ausgefällte Globulin nach Auflösung und Dialyse nur zum kleinen Teil wieder ab; die klare Lösung im Dialysator, welche reichlich Globulin enthält, kann man mit noch so großen Wassermengen verdünnen, ohne eine weitere Fällung hervorzurufen. Diese Tatsachen haben zuerst Marcus[5]) dazu geführt, ein wasserlösliches Globulin anzunehmen; es gelang ihm auch weiterhin, zu beweisen, daß der lösliche Teil den größten Teil des gesamten Serumglobulins bildet.

Von den Methoden, welche zur Untersuchung dieser Körper anwendbar sind, müssen aus rein analytischen Gründen die-



jenigen, welche sich auf vergleichende Stickstoffbestimmungen stützen, als die zuverlässigsten erscheinen. Sie sind in dieser Arbeit durchweg benutzt worden. Die Ergebnisse der Stickstoffbestimmungen, die bedeutende Abweichungen von denen Marcus' zeigen, sind in Tafel II zu finden.

Die fraktionierte Ausfällung des Globulins mittels Ammoniumsulfat, welche in den Arbeiten von Pick[6]) sehr interessante qualitative Ergebnisse geliefert hat, wurde nach gründlichen Versuchen verworfen, weil es unmöglich war, die quantitativen Grenzen der verschiedenen Fraktionen festzustellen. Eine ausgezeichnete Übersicht der Literatur dieses Gegenstandes findet man in Hammarstens letzter Zusammenstellung[7]).

Die Existenz des wasserlöslichen Globulins wird noch nicht allgemein anerkannt, wahrscheinlich weil die wässerige Lösung derselben durch hydrolytische Spaltung langsam in Zersetzung übergeht, selbst nach Filtrieren durch keimfreie Tonfilter. Diese Zersetzung geschieht aber sehr langsam und wirkt nicht störend auf die quantitativen Bestimmungen ein.

Das unlösliche Globulin bildet einen verhältnismäßig kleinen Teil des gesamten Globulins. Bei Untersuchung dieses Körpers wurde gefunden, daß Serum einerseits durch Abscheidung des unlöslichen Globulins mittels Dialysieren, andererseits durch Verdünnen auf 10 Volume und Ausfällung mittels Kohlensäure denselben quantitativen Verlust an Stickstoff erleidet. Daraus folgt, daß durch beide Verfahren derselbe Körper abgeschieden wird.

Das unlösliche Globulin entspricht im allgemeinen dem „Serumglobulin“ der Lehrbücher, aber die Angaben betreffs seiner Löslichkeit sind größtenteils unrichtig. Die frisch ausgefällte Substanz, wiederholt mit destilliertem Wasser durch Zentrifugierung ausgewaschen, löst sich leicht bei Gegenwart sehr kleiner Spuren von Säure, ist auch leicht löslich bei Gegenwart der geringsten Spuren Alkali-Hydroxyd und -Karbonat; die Lösungen sind absolut wasserklar. Der Körper löst sich aber nur unvollkommen in verdünnten Lösungen von Neutralsalzen; solche Lösungen bleiben immer mehr oder weniger trübe. Aus verdünnten Lösungen in Säure oder Alkali wird es nicht durch Kohlensäure ausgefällt. Hieraus ist zu schließen, daß die Lösung nur durch Wasserstoff- und Hydroxylionen vermittelt wird, nicht aber durch die Ionen der Neutralsalze.

Der Unterschied zwischen dem Gesamtstickstoff und dem Stickstoff des Globulins wurde nach Subtraktion des in Extraktivsubstanzen gebundenen Stickstoffs als Eiweiß berechnet. Die reine Substanz erhält man in Lösung durch Aussalzung der Globuline mittels Magnesiumsulfat, mit nachheriger vollständiger Dialysierung des Filtrats. Man spart

viel Zeit, wenn man von folgenden Gleichungen Gebrauch macht. $MgSO_4 + Ba(OH)_2 = BaSO_4 + Mg(OH)_2$, und $Mg(OH)_2 + CO_2 = MgCO_3 + H_2O$. Eine kleine Menge Magnesiumkarbonat bleibt in Lösung und muß durch Hinzufügung einer Spur verdünnter Schwefelsäure neutralisiert werden, ehe man mit der Dialyse beginnt.

Tafel II.

Die quantitaven Verhältnisse der Serumeiweißstoffe.
(Bestimmungen nach Kjeldahl ausgeführt und prozentisch berechnet.)

	Versuchsreihe I 19. März	Versuchsreihe II 14. April	Versuchsreihe III 10. Mai	Versuchsreihe IV 5. Juni	Mittelwerte
Spez. Gewicht	1,0312	1,0275	1,0287	1,0290	1,0291
Gesamteiweiß	7,9599	8,2559	8,1097	8,4474	8,1932
Albumin	4,7415	4,3243	4,2687	4,3243	4,4147
Wasserlösliches Globulin	*2,9981	*2,9638	*3,0769 **3,0809	**3,0780	3,0292
Im Wasser unlösliches Globulin	*0,2903	*0,9578	*0,7641 **0,7601	**1,0451	0,7468
Stickstoff in diffusionsfähigen Substanzen	0,1932	0,1900	0,2240	0,1932	0,2001

*Ausfällung durch Dialyse.
**Ausfällung mittels Kohlensäure.

Die Zahlen beziehen sich auf die verschiedenen Proteinfraktionen eines bestimmten Tieres. Es sind die Resultate von fast hundert gut stimmenden Analysen des Serums eines Individuums zu verschiedenen Zeiten. Alle Angaben sind das Mittel von mindestens drei Stickstoffbestimmungen.

Wir wenden uns nunmehr zur Besprechung der Frage der spezifischen Wirkung.

Technik. — Sämtliche Bestimmungen der spezifischen Wirksamkeit sind unter gleichen Bedingungen ausgeführt worden. Kaninchenblutkörperchen wurden durch Blutentziehung aus einer kleinen Ader erhalten. Das Blut stand bis zur völligen Gerinnung, worauf das klare Serum leicht zu gewinnen war. In diesem wurde sodann eine Erythrocytenaufschwemmung hergestellt durch Umschütteln eines kleinen Stückchens des frischen Blutkuchens, bis die Farbe einer 5proz. Aufschwemmung derselben Zellen in 0,85proz. Salzlösung glich. Zwei Teile der zu prüfenden Flüssigkeit wurden mit drei Teilen der Aufschwemmung mittels Pipette des Thoma-Zeißschen Blutkörperchenzählapparates gemischt. Die Mischung wurde sodann in die Zählkammer des Apparats bei 35° C gebracht, mit dem Glasdeckel bedeckt, das Präparat auf das Stativ eines Mikroskops gebracht und das Ganze in einem Thermostaten bei 35° C gehalten.

Die Herstellung gut arbeitender Membranen für die Dialyse bot einige Schwierigkeiten. Nach vielen Vorversuchen wurden die „Diffusionshülsen" von Schleicher und Schüll als zuverlässig ausgewählt. Sie gestatten die vollständige Dialyse von 10 ccm Serum bei Gegenwart eines großen Überschusses destillierten Wassers in drei bis fünf Tagen. Da zuweilen eine Hülse die Eiweißkörper nicht zurückhält, muß man sämtliche Dialysen dreifach durchführen und das Wasser in den Außengefäßen auf Eiweißkörper mittels der Biuret- und anderer Reaktionen prüfen. Die Dialyse wurde als beendet angesehen, sobald es nicht möglich war, in den Flüssigkeiten eine Reaktion mit Silbernitrat oder Baryumchlorid hervorzurufen.

a) Die Beziehung der diffundierbaren Serumbestandteile zur Erythrolyse.

Hat man ein sehr aktives Serum (z. B. mit einer Reaktionszeit von einer Minute) dialysiert, so findet man, daß die Reaktion damit sofort eintritt, aber auch, daß die Reaktion qualitativ verändert ist, indem sofort klare Lösung eintritt, also ohne die trüben Vorstadien, welche für den echten Prozeß charakteristisch sind. Dasselbe Resultat erhält man, falls man ein weniger aktives dialysiertes Serum prüft; die Reaktion erfolgt augenblicklich, das heißt, die Zellen werden zerstört. Wird zu dem dialysierten Serum die Menge Chlornatrium zugesetzt, die genügt, das Serum isotonisch zu machen, so erfolgt die spezifische Erythrolyse regelmäßig in derselben Zeit, wie bei dem ursprünglichen Serum. Zuweilen wird die Reaktion etwas verzögert, was wohl entweder auf eine kleine Verdünnung infolge des Dialysierens, oder auf einen Verlust beim Dialysieren zu beziehen ist. Die Erklärung dieser vielfach wiederholten Versuche liegt auf der Hand; dialysiertes Serum wirkt wie destilliertes Wasser und verursacht Lösung der Erythrocyten durch Verminderung des osmotischen Druckes.

In dieser Weise konnte gezeigt werden, daß das Serum nach Entfernung sämtlicher diffundierbaren Substanzen und nachträglicher Herstellung seines isotonischen Druckes durch Chlornatrium vollauf die ursprüngliche spezifische Wirksamkeit besitzt. Andere Salze leisten dasselbe wie Chlornatrium. Die Erythrolyse ist somit in keiner Weise an die Anwesenheit der diffundierbaren Elemente des Serums geknüpft; diese erhalten nur durch Aufrechterhaltung eines bestimmten osmotischen Druckes die Zellmembranen intakt.

Die Grenze der Resistenz der roten Blutkörperchen gegen anisotonische Lösungen läßt sich physikalisch leicht ermitteln. Die Verhältnisse sind von Hamburger[8]) eingehend geprüft worden. Nach ihm hängt das Verhalten einer Zelle in einer Salzlösung von

bestimmter Konzentration ab: 1. „Von der absoluten Volumvermehrung, welche die intraglobuläre Flüssigkeit durch ihr Wasseranziehungsvermögen erfährt.“ 2. „Von dem Widerstande, welchen die äußere, der Ausdehnung unterworfene protoplasmatische Begrenzung dem Durchgang dieser Flüssigkeit bietet.“

Ich habe schon gezeigt[9]), daß mäßige Veränderungen der isotonischen Konzentration ohne Wirkung sind. Nach Thierfelder[10]) verlieren die roten Zellen der Säugetiere im allgemeinen ihren Farbstoff in Lösungen, die weniger als 0,6 Proz. Chlornatrium enthalten.

b) Die Beziehung des löslichen Globulins zur Erythrolyse.

Das lösliche Globulin beträgt etwa achtzig Prozent (80,02) des gesamten Globulins. Die Darstellung dieses Körpers in reinem Zustande bietet keine großen technischen Schwierigkeiten, verlangt aber großen Zeitaufwand. Sämtliche Methoden zur Isolierung dieses Körpers laufen auf Aussalzung mit nachfolgender Dialyse hinaus.

Ein gemessenes Volum aktiven Serums wird mit neun Teilen destillierten Wassers verdünnt; darauf wird ein starker Strom Kohlensäure durchgeleitet, das unlösliche Globulin wird vollständig abgeschieden und setzt sich in fünf bis acht Stunden scharf ab. Von der klaren überstehenden Flüssigkeit, welche das lösliche Globulin, Albumin und die diffundierbaren Stoffe enthält, wird ein aliquoter Teil abgemessen und mit Magnesiumsulfat gesättigt; das lösliche Globulin wird hierdurch in der Form eines weißen gelatinösen Niederschlages abgeschieden. Nun wird unter Druck filtriert und der Niederschlag so lange mit einer gesättigten Magnesiumsulfatlösung gewaschen, bis das Filtrat weder Biuret- noch andere Eiweißreaktionen gibt. Das Filtrat ist wasserklar. Das lösliche Globulin wird vom Filter abgenommen, in einer möglichst kleinen Menge Wasser gelöst und durch Dialysieren von Magnesiumsulfat vollständig befreit. (Fehlen der Sulfatreaktion.) Während der Dialyse wird kein Eiweißkörper ausgeschieden. Die Lösung ist auch nach vollständiger Dialyse vollkommen klar und mit Wasser in allen Verhältnissen ohne Trübung mischbar. Die Gegenwart des löslichen Globulins läßt sich leicht durch Eiweißreaktionen und Salzfällung nachweisen. Um den Körper in wasserfreiem Zustande zu erhalten, braucht man nur die salzfreie Lösung im Vakuum über Chlorkalzium zu trocknen.

Bei der Darstellung dieses Körpers wurde von einem aliquoten Teil des Serums ausgegangen. Um auf die spezifischen Eigenschaften zu prüfen, muß das lösliche Globulin auf das ursprüngliche Volum zurückgebracht werden. Da das Volum während der Dialyse immerzu wächst, so braucht man nur bis zu dem bestimmten Punkt im Vakuum über Chlorkalzium einzuengen. Die Lösung wird dann durch Zufügung der berechneten Menge Chlornatrium isotonisch gemacht.

Isotonische Lösungen von löslichem Globulin, in dieser Weise bereitet und auf ihre spezifische Wirksamkeit geprüft, haben aus-

nahmslos negative Resultate gegeben, die Blutkörperchen blieben wie in isotonischen Salzlösungen vollkommen unverändert.

Es mag an dieser Stelle erwähnt werden, daß während der Darstellung die Lösungen von löslichem Globulin niemals Zeichen von Bakterieninfektion gaben. Die Entscheidung über die Frage nach der Existenz einer spezifischen Wirkung dieses Serumanteils kann aber nur mit Vorbehalt getroffen werden. Es ist nicht undenkbar, daß durch den Eingriff, den die chemische Behandlung bedingt, die spezifische Eigenschaft verloren geht. Dazu kommt noch der Umstand, daß, ehe der Körper in reinem Zustande zu erhalten ist, beträchtliche Zeit (sieben bis zwölf Tage) verfließt.

c) Die Beziehung des unlöslichen Globulins zur Erythrolyse.

Dieser Körper läßt sich mittels einer direkten oder einer indirekten Methode darstellen. Bekanntlich kann er durch Dialysieren oder Kohlensäurewirkung abgeschieden werden. Wird ein klares Serum mit neun Teilen Wasser verdünnt und der Wirkung eines Stromes Kohlensäure durch längere Zeit ausgesetzt, dann fällt das unlösliche Globulin aus und aus der klaren überstehenden Flüssigkeit ist durch Kohlensäure kein weiterer Niederschlag zu erzielen.

Der größte Teil der Flüssigkeit wird durch sorgsames Dekantieren entfernt, der Niederschlag wird dann zentrifugiert, die Flüssigkeit abgehoben, der Niederschlag in destilliertem Wasser verteilt und wieder zentrifugiert usw., bis das Waschwasser salz- und eiweißfrei ist. Der Niederschlag wird aufs Filter gebracht und abtropfen gelassen. Man hat dann eine weiße, undurchsichtige breiige Masse. Läßt man sie in dünner Schicht über Chlorkalzium bei Zimmertemperatur trocknen, so wird sie durchsichtig, sobald sie wasserfrei ist; wenn vollkommen trocken, bildet sie derbe, farblose Schollen. Der Körper läßt sich wegen der elektrischen Eigenschaften des Staubes schwierig pulvern. Unlösliches Globulin läßt sich, wenn einmal völlig getrocknet, von Säuren oder Alkalien nicht so leicht in Lösung bringen wie die frische Substanz.

Das wasserunlösliche Globulin kann auch durch Dialysieren abgeschieden werden. Der Niederschlag wird dann wie oben angegeben gereinigt.

Läßt man Kohlensäure durch Serum gehen, das bis zur Salzfreiheit dialysiert worden ist, so läßt sich kein weiterer Niederschlag abscheiden. Das heißt, das gesamte unlösliche Globulin ist durch die Dialyse abgeschieden. Wird ein vollständig dialysiertes Serum mit neun Teilen Wasser verdünnt, so erfolgt auch keine Fällung; im Laufe der Zeit aber wird die Lösung ein wenig trübe, wohl durch hydrolytische Spaltung. Andererseits vermag Kohlensäure die quantitative Ausfällung des unlöslichen Globulins nur bei einer zehnfachen Verdünnung zu erzielen, wahrscheinlich weil eine solche Verdünnung nötig ist, um die lösende Wirkung der diffundierbaren Substanzen aufzuheben.

Wie bereits bemerkt, löst sich das unlösliche Globulin nur unvollkommen in Lösungen von Neutralsalzen. Da nun die Prüfung auf die spezifische Wirksamkeit einer isotonischen Lösung bedarf, wandten wir einen kleinen Kunstgriff an. Wenn man ein bestimmtes Volum Serum gegen ein bestimmtes Volum destilliertes Wasser dialysiert und nachher das ganze Wasser bei niedriger Temperatur verdampft, enthält der Rückstand sämtliche nichtflüchtige diffundierbare Bestandteile des Blutes. Durch Auffüllen dieses Rückstandes auf das ursprüngliche Volum erhält man eine isotonische Lösung, in der unlösliches Globulin sich leicht und vollkommen löst.

Wie man sieht, ist eine solche Lösung in quantitativer wie in qualitativer Hinsicht ideal. Wahrscheinlich besteht der Unterschied zwischen dem Lösungsvermögen einer Salzlösung und dieser Lösung der Serumsalze auf einem kleinen Gehalt der letzteren an Karbonaten, die durch Hydrolyse eine Spur alkalischer Reaktion bedingen. Solche Lösungen zeigen mit Lackmus und den gewöhnlichen Indikatoren geprüft immer eine deutlich alkalische Reaktion.

In einer langen Reihe von Versuchen wurde auf die spezifische Wirkung der Lösungen von unlöslichem Globulin geprüft, immer mit negativem Resultat. Verwendet man nicht vollkommen ausgewaschene Niederschläge, so kann man Spuren einer spezifischen Wirkung bemerken. Diese ist aber den anhaftenden Serumbestandteilen zuzuschreiben, da sie vollkommen ausgewaschenen Niederschlägen ganz fehlt. Die Abwesenheit der spezifischen Wirkung läßt sich viel leichter durch ein indirektes Verfahren zeigen, das bequemer und rascher ausführbar ist. Man verdünnt ein bestimmtes Volum Serum mit neun Teilen Wasser und scheidet das unlösliche Globulin durch Kohlensäure ab; ein bestimmter Teil des klaren Serums wird, nach Absetzen des unlöslichen Globulins, im Vakuum über Chlorkalzium bei Zimmertemperatur zum ursprünglichen Volum eingeengt. In dieser Weise erhält man ein Serum, das frei ist von unlöslichem Globulin, die ursprüngliche isotonische Konzentration besitzt und sich nur in einer Hinsicht von dem nativen unterscheidet, durch die Abwesenheit des unlöslichen Globulins. Ein solches Serum besitzt die spezifische Wirksamkeit des nativen Serums. Diese Beobachtung, die wiederholt an verschiedenen Sera gemacht worden ist, lehrt, daß das unlösliche Globulin keinen Anteil an der spezifischen Wirkung haben kann.

Die Resultate des indirekten Verfahrens decken sich also mit denen des direkten und es ist damit bewiesen, daß dem wasserunlöslichen Globulin keine spezifische Wirksamkeit zukommt.

d) Die Beziehung des Serumalbumins zur Erythrolyse.

Eine solche hat sich nicht sicher feststellen lassen. Wird ein aktives Serum mit Magnesiumsulfat gesättigt und von den abgeschiedenen Globulinen abfiltriert, so hat man in dem Filtrat sämtliches Albumin. Ein solches Filtrat wurde jetzt, wie bei der Darstellung des löslichen Globulins beschrieben, dialysiert und eingeengt, dann durch Salzzusatz isotonisch gemacht und geprüft. Die Resultate waren immer vollkommen negativ.

Ich bin mir aber wohl bewußt, daß das Verfahren nicht einwandsfrei ist. Erstens ist es technisch sehr schwierig und sehr zeitraubend. In dem Albumin enthaltenden Filtrat findet sich eine große Menge Magnesiumsulfat und dieses Salz durch Dialyse zu entfernen, kostet viel Zeit und bedingt eine große Volumvermehrung des Dialysats. Versucht man diese Lösung einzuengen, so geht das so langsam von statten, daß es sehr schwierig ist, Bakterienwirkung auszuschließen. Um das zu vermeiden, habe ich die Lösung isotonisch gemacht und direkt geprüft, ein Verfahren, das aber eine Verdünnung der Eiweißkomponenten des Serums zur Folge hat. Es ist also klar, daß, obwohl sämtliche Versuche negativ ausgefallen sind, den Resultaten eine strenge Gültigkeit nicht zugesprochen werden darf.

Aus dem Mitgeteilten ist ersichtlich, daß die diffundierenden Substanzen an sich keine direkte Beziehung zu der Entfaltung der spezifischen Wirkung haben.

Von den drei Eiweißkörpern des Serums ist nur für einen, das unlösliche Globulin, endgültig gezeigt worden, daß er jeder spezifischen Wirkung entbehrt; auch für einen zweiten, das lösliche Globulin, ist das gleiche, obwohl nicht vollkommen streng, bewiesen. Es bleibt also nur das Serumalbumin übrig. Die Versuche damit, wenngleich negativ, sind nicht einwandfrei genug, um endgültig die Behauptung zu erlauben, daß die spezifische Wirkung überhaupt mit keinem Eiweißkörper des Serums in Beziehung steht. Daß aber diese Wirksamkeit an ein Kolloid geknüpft ist, steht fest. Sie muß also entweder an spezifische Körper geknüpft sein, d. h. ein eigenes chemisches Dasein besitzen, oder solche Körper sind an das Albumin-Molekül gebunden und werden bei den beschriebenen Versuchen nur abgetrennt oder vernichtet. Nicht nur die negativen Resultate dieser Versuchsreihen, sondern auch die allgemeinen physikalisch-chemischen Betrachtungen lassen es am wahrscheinlichsten erscheinen, daß die spezifische Wirksamkeit an Kolloide geknüpft ist, welche mit Serumalbumin keinen Zusammenhang haben.

Wenn wir nun annehmen, daß auch Serumalbumin gleich den Globulinen unwirksam ist, so bleibt analytisch nichts übrig, woran

sich eine Vorstellung über die qualitativen oder quantitativen Verhältnisse dieses vermuteten Kolloids knüpfen ließe. Man kennt nur die spezifischen Eigenschaften und nichts weiter. Diese Erfahrung hat man so oft bei der Untersuchung und Prüfung von Fermenten gemacht, daß es sehr nahe liegt, auch die spezifische hämolytische Wirkung unter die Fermentwirkungen einzureihen. Der ganze Verlauf dieser spezifischen Reaktion hat überdies mit den katalytischen Prozessen die größte Ähnlichkeit. In seinen Betrachtungen über Katalyse hat Bredig[1]) über die wahre Natur der Enzymwirkung folgendes geäußert: „Man wird wohl den Eindruck gewonnen haben, daß vorderhand noch kein Grund vorliegt, in den Enzymen andere geheimnisvollere Kräfte tätig zu glauben als bei den gewöhnlichen Kontaktsubstanzen".

Man muß darüber klar sein, daß die sogenannte Seitenkettentheorie von Ehrlich nicht in den Rahmen der modernen Theorie der Fermentwirkung hineinpaßt. Nach dieser Theorie wird bei dem Zusammentreffen von aktivem Serum und Blutkörperchen (ebenso in anderen ähnlichen Fällen) durch die Vermittelung des Ambozeptors eine Reaktion de novo eingeleitet; die Enzymwirkung aber, wie jede katalytische Wirkung, besteht nur in der Beschleunigung einer bereits langsam verlaufenden Reaktion.

Schlußfolgerungen:

1. Die diffusionsfähigen Substanzen spielen keine Rolle bei der spezifischen Erythrolyse, sondern halten nur den osmotischen Druck aufrecht.

2. Allem Anschein nach besitzt das lösliche Globulin keine spezifische Wirksamkeit.

3. Sie fehlt sicher dem unlöslichen Globulin.

4. Höchstwahrscheinlich auch dem Serumalbumin.

5. Vom theoretischen wie vom praktischen Standpunkt aus ist man vorläufig berechtigt anzunehmen, daß die spezifische Erythrolyse einer Wirkung von spezifischen kolloidalen Körpern nach Art der Enzymwirkung entspricht.

Diese Arbeit ist mit Unterstützung des Rockefeller Institut of Medical Research ausgeführt worden. Zum Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. A. E. Taylor für die Anregung zu dieser Arbeit sowie für die liebenswürdige Unterstützung bei der Ausführung derselben meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Literaturverzeichnis.

[1]) **Bredig**, G., Die Elemente der chemischen Kinetik mit besonderer Berücksichtigung der Katalyse. Ergebnisse der Physiologie. 1. Jahrg. I. Abt. „Biochemie". 1902.

[2]) **Green-Windisch**, Die Enzyme. Berlin 1901, S. 438.

[3]) **Hardy**, W. B., Colloidal Solution. Journ. of Physiology **29**, 4. and 5. June 1903.

[4]) **Quinan**, On the Quantitative Separation of the Globulins of Hemolytic Serum with Special Reference to the Carbon Dioxide Group. Univ. of California Publications. Pathology. Vol. I, Nr. 1.

[5]) **Marcus**, E., Über ein wasserlösliches Serumglobulin. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie **28**, 1899.

[6]) **Pick**, E., Zur Kenntnis der Immunkörper. Diese Beiträge **1**, 1901.

[7]) **Hammarsten**, O., Über die Eiweißstoffe des Blutserums. Ergebnisse der Physiologie. 1. Jahrg. I. Abt. „Biochemie". 1902. — Über die Anwendbarkeit des Magnesiumsulfates zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Serumalbumin und Globulinen. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie **8**, 1884.

[8]) **Hamburger**, H. J., Osmotischer Druck und Ionenlehre in den medizinischen Wissenschaften. Wiesbaden 1902, S. 368 bis 394.

[9]) **Quinan**, The Relations of Specific Gravity and Osmotic Pressure to Hemolysis. — Journ. of Med. Research. Vol. X. Nr. 1, Aug. 1903.

[10]) **Thierfelder**, H. F., Hoppe-Seylers Handbuch der phys. u. path.-chem. Analyse. Berlin 1903, S. 487.

VIII.

Über das Sekret der Bürzeldrüsen.

Von **F. Röhmann.**

Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Instituts zu Breslau.

Zu den wichtigsten Stützen der Lehre von der fettigen Metamorphose gehörte nach Virchow die Tatsache, daß das fettige Sekret der Milch- und der ihnen verwandten Talgdrüsen in der Weise entstehe, daß beim Sekretionsvorgange die nach dem Ausführungsgange zu gelegenen Drüsenzellen zerfallen, während von der Peripherie des Acinus neue Zellen zu ihrem Ersatz vorrücken. Bei dem Untergang der Zellen bilde sich Fett aus Eiweiß. Durch die histologischen Untersuchungen Heidenhains ist die Unhaltbarkeit jener Ansicht für die Milchdrüsen nachgewiesen worden. Von den Talgdrüsen sagt aber auch Heidenhain*), daß in ihnen von einer eigentlichen Absonderung keine Rede sei: „Wucherung des Epithels und fortschreitende Verfettung der Zellen ist das Wesentliche des Vorgangs. Ähnlich verhält sich nach Robby Kossmann die Bürzeldrüse der Vögel. Sie setzt sich aus in eine gemeinschaftliche Höhle mündenden Schläuchen zusammen, innerhalb deren ebenfalls durch Zellwucherung und Verfettung das Sekret entsteht."

Die Bildung von Fett aus Eiweiß ist nun bekanntlich sehr zweifelhaft geworden, ein sicherer, experimenteller Beweis für sie ist bis jetzt noch nicht erbracht; somit entbehrt auch die herrschende Ansicht über die Bildung des Sekrets der Talgdrüsen einer sicheren Grundlage. Die histologischen Beobachtungen allein können uns dieselbe nicht geben. Die bisher gemachten mikroskopischen Untersuchungen der Talgdrüsen können ebenso unvollkommen sein als es vor den Untersuchungen Heidenhains die der Milchdrüse waren. Wenn in der Milchdrüse das Fett nicht durch Degeneration der Drüsenepithelien entsteht,

*) L. Hermann, Handbuch der Physiologie 5, 407.

wenn die Milchdrüse, woran nach zahlreichen Beobachtungen gar nicht zu zweifeln ist, Fett ausscheidet, welches ihr durch den Blutstrom zugeführt wird, so könnte ein gleiches auch bei den Talgdrüsen der Fall sein.

Ob dies zutrifft, ließe sich experimentell entscheiden. Man könnte, ähnlich wie in den bekannten Versuchen von Radzijewski, J. Munk und G. Rosenfeld, ein Tier mit einem Fett, das sich in bestimmter Weise von seinem Körperfett unterscheidet, füttern und untersuchen, ob dieses Fett, ähnlich wie es in dem Fettgewebe abgelagert wird, auch in die Talgdrüsen hineingelangt und von ihnen als Sekret wieder abgeschieden wird.

Die Ausführung solcher Versuche beim Menschen stößt, wie leicht begreiflich, auf fast unüberwindliche Schwierigkeiten. Man kann die Versuche aber an Vögeln anstellen. Sie besitzen in ihren Bürzeldrüsen ein Organ, welches nach Entwickelung, Bau und Funktion einer Talgdrüse entspricht. Das Sekret ist leicht in hinreichenden Mengen zu gewinnen.

Geht nach Fütterung eines bestimmten Fettes dieses Fett in das Sekret der Bürzeldrüse über? Diese Frage war von Prof. Dr. A. Neißer aufgeworfen worden. Auf seine Anregung hatte J. Plato unter meiner Leitung die Versuche begonnen, als unerwartet der Tod dem Leben dieses jungen, ungewöhnlich begabten Forschers ein Ende machte. Die Ergebnisse, die Plato bei seinen Versuchen erhielt, hat er bereits in einer vorläufigen Mitteilung niedergelegt*). Mir gaben die Versuche Platos die Veranlassung, mich etwas eingehender mit dem Sekret der Bürzeldrüse zu beschäftigen. Über die Resultate meiner Versuche will ich im folgenden berichten und im Anschluß daran auf die Versuche Platos zurückkommen.

I. Die Bestandteile der Bürzeldrüse und ihres Sekrets.

Die Bürzeldrüsen sind über den untersten Schwanzwirbeln zu beiden Seiten der Mittellinie im Fettgewebe der Haut eingebettet. Ihr Sekret dient dazu, die Federn gegen Nässe und andere Schädlichkeiten zu schützen, ähnlich, wie auch das Sekret der Talgdrüsen der menschlichen Haut Schutz gegen die Atmosphärilien, insbesondere auch gegen Mikroorganismen gewährt. Durch Druck auf die Drüse läßt es sich entleeren und tritt hierbei ähnlich wie das Sekret der Talgdrüsen vom Menschen beim Ausdrücken von Comedonen aus dem Ausführungsgange in Wurstform als Masse von salbenartiger Konsistenz hervor. Die

*) Deutsche dermatolog. Gesellsch. VII. Kongreß. Breslau 1901, S. 182.

zuerst entleerten Anteile sind braun gefärbt und fester, die späteren farblos und weicher, fast rahmartig. Nach den Versuchen, welche de Jonge*) im Laboratorium Hoppe-Seylers ausgeführt hat, beträgt die Menge Sekret, die man bei einer Gans gewinnt, etwa 2,4 g. Es enthält nach de Jonge als sicher nachgewiesene Bestandteile: „Kaseïn, Albumin, einen phosphorhaltigen, in Wasser, Alkohol und Äther unlöslichen Körper (Nuklein), einen phosphorhaltigen, in Äther löslichen, verseifbaren Körper (Lecithin), Fette mit niederen und höheren fetten Säuren, einen näher zu untersuchenden, nicht verseifbaren Körper, von anorganischen Substanzen Kalium, Natrium, Kalzium, Magnesium und Chlor; als wahrscheinliche Bestandteile: freie Fettsäuren, sowie Spuren von Natrium- und Kaliumseifen." Von besonderem Interesse ist die Angabe de Jonges, daß der unverseifbare Körper Cetylalkohol ist.

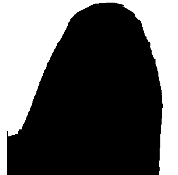
Das Mengenverhältnis der einzelnen Bestandteile ergibt sich aus der folgenden Analyse de Jonges. Das Sekret enthält in 1000 Teilen bei

	Gänsen		wilden Enten	
feste Bestandteile	391,93		415,34	
Wasser	608,07		584,66	
Eiweißstoffe und Nuklein	179,66		127,63	
in absolutem Äther lösliche Bestandteile	186,77		247,08	
Alkoholextrakt	10,90		18,31	
Wasserextrakt	7,53		11,31	
Asche	7,07	löslich 3,71 unlöslich 3,36	11,01	löslich 9,35 unlöslich 1,66
	im Ätherextrakt waren			
Cetylalkohol	74,23		104,02	
Ölsäure	56,48		—	
niedere Fettsäuren	3,73		14,84 (!)	
Lecithin	2,33			

Hieraus läßt sich berechnen, daß 40 bzw. 41 Proz. vom Ätherextrakt des Bürzeldrüsensekrets auf Cetylalkohol kommen.

Nähme man mit de Jonge an, daß dieser esterartig an Fettsäuren gebunden ist, so könnten an echtem Fett nur 10 bis 13 Proz. im Bürzeldrüsensekret enthalten sein. Das Sekret der Bürzeldrüse wäre also in seinen Hauptbestandteilen, den in Äther löslichen, kein Fett. Die Bürzeldrüsen enthielten vielmehr ganz bestimmte, für sie charakteristische Substanzen. Ihr Sekret ließe

*) David de Jonge, Über das Sekret der Talgdrüsen der Vögel und sein Verhältnis zu den fetthaltigen Hautsekreten der Säugetiere, insbesondere der Milch. Berlin 1879.



sich also, auch wenn es eine „fettige Degeneration" gäbe, gar nicht auf eine Linie stellen mit Fett, das in irgend welchen anderen Zellen durch fettige Degeneration entstanden wäre.

Die Beobachtungen de Jonges finden sich in den Lehrbüchern der physiologischen Chemie zitiert. Die prinzipielle Bedeutung, die ihnen, ihre Richtigkeit vorausgesetzt, für die Auffassung der Talgdrüsensekretion zukommt, ist aber bisher nicht beachtet worden und auch de Jonge selbst entgangen.

Zur Nachprüfung der Angaben de Jonges wurde untersucht 1. der Extrakt der Bürzeldrüsen selbst, 2. ebenso wie von de Jonge der Extrakt des Sekretes und zwar ausschließlich das von Gänsen.

Die Bürzeldrüsen von frisch geschlachteten Gänsen wurden herauspräpariert und von anhaftendem Fett befreit. Es gelingt dies sehr leicht, da die Drüsen in einer bindegewebigen Kapsel liegen und eine fast völlig glatte Oberfläche haben. Durch nicht zu starken Druck auf die Drüsen wurde das Sekret, soweit dies möglich war, entleert. Dieses und ebenso die zerkleinerte Drüsensubstanz wurden in 94 proz. Alkohol eingetragen und mehrmals mit Alkohol ausgekocht. Dann wurde mit Äther extrahiert. Nachdem so die Hauptmenge des Fettes extrahiert worden war, wurden die ungelöst bleibenden Massen in der Reibschale zerrieben und mit Chloroform völlig ausgezogen. Der Rückstand der ersten Alkoholextrakte wurde noch einmal mit starkem Alkohol aufgenommen. Das, was sich hierbei löste, wurde mit dem Ätherextrakt vereinigt. Der Rückstand dieser Extrakte wurde mit Äther aufgenommen. Hierbei blieb ein Teil in Äther unlöslich, der sich aber in Chloroform leicht löste. Ebenso wurde das Chloroformextrakt mit Äther behandelt; auch hier war neben einem in Äther löslichen ein in Äther unlöslicher, in Chloroform löslicher Teil vorhanden.

Man erhält also aus den Bürzeldrüsen und aus ihrem Sekret

1. einen in verdünntem Alkohol löslichen, in starkem Alkohol unlöslichen Teil,

2. einen in Äther und Chloroform löslichen Teil,

3. einen in Äther unlöslichen, in Chloroform löslichen Teil.

Der in starkem Alkohol unlösliche Teil des Extraktes wurde nicht näher untersucht.

Die Menge der in Chloroform löslichen Bestandteile der Bürzeldrüsen beträgt für die Drüsen von gut gemästeten 3,8 bis 4,2 kg schweren Gänsen 1,4 bis 1,6 g für jede Gans. Vom Gewicht der frischen Drüsen — sie wiegen 5,4 bis 8,2 g — ist dies 18 bis 22 Proz. Die in Chloroform löslichen Substanzen machen also einen sehr bedeutenden Teil der Drüsenmasse aus. Dies tritt noch mehr hervor, wenn man sie mit der trockenen, extraktfreien Substanz der Drüse vergleicht. Man findet dann auf

100 Teile der letzteren 110 bis 150 Teile der ersteren. Nur in Chloroform, nicht in Äther lösliche Bestandteile kommen auf 100 Teile trockener, extraktfreier Drüsensubstanz 9 bis 13 Proz. Sieht man also vom Wasser und der geringen Menge in wässerigem Alkohol löslicher, in starkem Alkohol unlöslicher Substanzen ab, so besteht mehr als die Hälfte der Drüsensubstanz aus Stoffen, die in Chloroform löslich sind.

Im Sekret finden sich nach de Jonge auf 100 Teile fester Substanz 47,7 bzw. 59,5 Teile ätherlöslicher, ich fand 60 Teile ätherlöslicher und 14 Teile chloroformlöslicher, in Äther unlöslicher Stoffe.

In der Bürzeldrüse selbst sind verhältnismäßig mehr ätherlösliche Bestandteile enthalten als in dem Sekret.

A. Die in Äther löslichen Bestandteile der Bürzeldrüse.

1. Allgemeine Eigenschaften des Ätherextraktes.

Das Ätherextrakt der Bürzeldrüse bildet ein klares, gelbes bis dunkelbernsteingelbes Öl, aus dem sich beim Stehen ein fester Anteil ausscheidet. Es reagiert fast neutral.

Die Säurezahl war 0,73 bis 3,4. Die Menge der freien Fettsäuren ist also nur äußerst gering, sie bewegt sich innerhalb derselben Grenzen wie bei den „Neutralfetten" des Fettgewebes.

Beim halbstündigen Kochen mit $^1/_2$-normal alkoholischer Kalilauge wird das Ätherextrakt vollkommen verseift. Die Verseifungszahl, d. h. die Menge Kaliumhydroxyd in Milligrammen, welche ein Gramm des Extraktes bindet, schwankte in den verschiedenen untersuchten Proben zwischen 136 und 175. Die Jodzahl war 15,5 bis 26,5.

Verseifungs- und Jodzahl sind bei weitem geringer als bei den gewöhnlichen Fetten (s. u. Hautfette der Gänse). Die niedrige Verseifungszahl weist darauf hin, daß das Ätherextrakt, wenn es Fette enthält, jedenfalls noch aus anderen Estern besteht, deren Alkohol ein höheres Molekulargewicht als das Glyzerin hat. Dieser wäre nach de Jonges Angaben Cetylalkohol.

Cholesterin und Cholesterinester, an die man auch denken könnte, enthält das Extrakt der Bürzeldrüsen der Gans nach meinen Erfahrungen nicht.

Ist nun die Angabe, daß die Bürzeldrüsen Cetylalkohol bilden, richtig? Nur insofern, als sich in ihrem Sekret ein dem Cetylalkohol sehr nahe stehender Alkohol findet, nämlich nicht Cetylalkohol, $C_{16}H_{34}O$, sondern Oktadecylalkohol, $C_{18}H_{38}O$.

2. Über den Oktadecylalkohol der Bürzeldrüsen.

De Jonges Beobachtungen stimmen, wie er selbst bemerkte, nicht genau zu der Annahme, daß der von ihm gefundene Alkohol Cetylalkohol ist. Nach Heintz ist der Schmelzpunkt des Cetylalkohols 49,5°. De Jonge fand 56,5°.

Cetylalkohol, $C_{16}H_{34}O$, fordert	79,34	Proz. C	14,05	Proz. H
de Jonge fand	78,90	„ „	13,79	„ „
	79,61	„ „	13,56	„ „

Beim Schmelzen mit kaustischem Kalium entstand unter Entwickelung von Wasserstoff eine in Äther lösliche fette Säure, deren Schmelzpunkt (59°) 3° unter dem der reinen Palmitinsäure lag.

Zur Darstellung des Oktadecylalkohols verfährt man am besten in folgender Weise.

50 g Bürzelextrakt werden mit 20 g Kaliumhydroxyd und 500 ccm 94 proz. Alkohol und einigen Bimssteinstückchen ½ bis 1 Stunde auf dem Wasserbade am Rückflußkühler gekocht. Die Flüssigkeit wird mit etwa dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und das Alkali mit Salzsäure neutralisiert, jedoch nur soweit, daß die Flüssigkeit Curcumapapier noch stark bräunt. Dann wird, noch ehe die Flüssigkeit vollkommen erkaltet ist, mit Petroläther (vom Wasserbad abdestillierbare Fraktion) ausgeschüttelt. Der erste Petroläther wird bald abgegossen, damit sich der Oktadecylalkohol nicht beim Erkalten schon im Schüttelgefäß ausscheidet. Von den Petrolätherextrakten wird der Petroläther abdestilliert und der Rückstand zur Entfernung von Seifen so lange mit heißem Wasser behandelt, bis dasselbe rotes Lackmoidpapier nicht mehr bläut. Die Ausbeute betrug mehr als 40 Proz. des Extraktes.

Der so gewonnene Rohalkohol ward mehrmals aus Petroläther und einmal aus Alkohol umkristallisiert. Er besitzt folgende Eigenschaften. Aus Petroläther kristallisiert er in atlasglänzenden, sich fettig anfühlenden, dünnen Plättchen, die unter dem Mikroskop aus einem zierlichen, vielgestaltigen, mit feinen Spitzen besetzten Balkenwerk bestehen, das durch Zusammenwachsen von länglich ovalen, an beiden Enden scharf zugespitzten Plättchen entstanden ist. Läßt man ihn sich im Kühlen sehr langsam aus Petroläther abscheiden, so bildet er kleine weiße Drusen. Aus wasserhaltigem Alkohol kristallisiert er in feinen Nadeln, die sich zu radiär gestreiften Kugeln zusammenlegen. Der Schmelzpunkt liegt bei 58,5° C (unkorr.), nach Krafft*) bei 59°.

Für $C_{18}H_{38}O$ ber.	80,0	Proz. C,	14,1	Proz. H.
gef.	80,0	„ „	14,2	„ „
	79,7	„ „	14,2	„ „

*) Berichte d. deutsch. chem. Ges. 16, 1714.

Aus dem Oktadecylalkohol wurde nach dem Verfahren von Krafft*) der Palmitinsäure- und Stearinsäureester dargestellt.

Der Palmitinsäureester wurde aus Äther und kochendem Alkohol unter Zusatz von wenig Äther umkristallisiert. Schmp. 57,5° (unkorr.), nach Krafft 59° Verseifungszahl ber. 110,4, gef. 115,6.

Für $C_{34}H_{68}O_2$ ber. 80,2 Proz. C, 13,5 Proz. H
gef. 79,4 „ „ 13,4 „ „
79,4 „ „ 13,2 „ „

Der aus dem verseiften Ester wiedergefundene Alkohol schmolz bei 59° C (unkorr.).

Der Stearinsäureoktadecylester wurde aus viel kochendem Äther umkristallisiert, er schmolz bei 61,5° C.

Die Verseifungszahl wurde gefunden zu 104,3, berechnet 104,5.

für $C_{36}H_{72}O_2$ ber. 80,5 Proz. C, 13,5 Proz. H
gef. 80,4 „ „ 13,7 „ „

Durch Erhitzen mit Natronkalk wurde der Oktadecylalkohol in Stearinsäure übergeführt.

2 g Oktadecylalkohol wurden etwa 20 Stunden mit 8 g Natronkalk auf 270 bis 280° erhitzt. Die Masse wurde mit Alkohol verrieben und unter Erwärmen mit Salzsäure behandelt, dann mit Wasser verdünnt und abkühlen gelassen. Die rohe Stearinsäure wurde mit Wasser gewaschen und in Methylakohol gelöst, durch Zusatz von methylalkoholischer Barytlösung wurde das stearinsaure Baryum gefällt. Es wurde mit Äthylalkohol ausgekocht, darauf mit Salzsäure zerlegt und mit Äther aufgenommen. Die ätherische Lösung wurde mit Wasser geschüttelt, der Äther filtriert und der Ätherrückstand aus Alkohol umkristallisiert. Ausbeute mehr als 1,3 g. Schmp. 68,5° (unkorr.) Stearinsäure schmilzt bei 69,2°

für $C_{18}H_{36}O_2$ ber. 76,0 Proz. C, 12,7 Proz. H
gef. 76,2 „ „ 12,8 „ „
Säurezahl ber. 197,2, gef. 196,9.

Die Mutterlaugen, aus denen sich der Oktadecylalkohol abgeschieden hatte, zeigten einen niedrigeren Schmelzpunkt als 58° (bis 50°). Es konnte hiernach neben dem Oktadecylalkohol vielleicht auch noch Cetylalkohol vorhanden sein. Durch fraktionierte Kristallisation selbst bei Anwendung größerer Mengen ließ sich dieser jedoch nicht gewinnen. Es wurde deshalb ein Verfahren versucht, mittels dessen es Krafft gelungen war — und seine Angaben kann ich bestätigen — im Walrat neben Cetylalkohol Oktadecylalkohol nachzuweisen, nämlich die fraktionierte Destillation der Essigsäureester.

Nach Krafft siedet Oktadecylazetat unter einem Drucke von 15 mm Hg bei 222 bis 223°, Cetylazetat bei 199 bis 201°. Als

*) Berichte d. deutsch. chem. Ges. **16**, 3018.



ich 23 g des aus den Bürzeldrüsen gewonnenen Rohalkohols durch Kochen mit Essigsäureanhydrid in den Essigsäureester überführte und diesen bei erniedrigtem Druck (etwa 50 mm Hg) destillierte, so gingen unterhalb 220° nur wenige Tropfen über, die Destillation erfolgte bei 225°, übrigens bereits unter geringer Zersetzung. Cetylazetat siedete unter denselben Bedingungen bei 198 bis 200°. Auch dieser Versuch spricht gegen die Anwesenheit von Cetylalkohol.

Der Oktadecylalkohol ist also der einzige in Äther lösliche Alkohol, der in den Bürzeldrüsen enthalten ist.

Zur Bestimmung der Menge des im Bürzeldrüsenextrakte enthaltenen Oktadecylalkohols wurde folgendermaßen verfahren:

1 bis 2 g des Extraktes wurden wie bei der Bestimmung der Verseifungszahl mit 25 ccm halbnormaler alkoholischer Kalilauge im Kölbchen auf dem Wasserbade eine halbe Stunde bis zum gelinden Sieden erhitzt. Die Flüssigkeit wird nach Zusatz von Phenolphtalein mit Halbnormalsalzsäure neutralisiert und durch Zufügen einer kleinen Menge der alkoholischen Kalilauge wieder stark alkalisiert; sie wird in einen Schütteltrichter übergefüllt und mit Petroläther ausgeschüttelt. Die vereinigten Petrolätherlösungen bleiben in einem Kolben bis zum folgenden Tage stehen; sie werden durch ein trockenes Filter in einen trockenen Kolben filtriert. Der Petroläther wird vom Wasserbade abdestilliert und der Rückstand im Leuchtgasstrome auf kochendem Wasserbade erhitzt. Er wird in Äther (über Natrium destilliertem) gelöst, wenn nötig durch ein trockenes Filterchen filtriert, in einem gewogenen Gläschen verdunstet und bis zur Gewichtskonstanz über Schwefelsäure stehen gelassen.

Die Menge des Oktadecylalkohols ist eine sehr erhebliche, sie beträgt 40 bis 45 Proz. des Bürzeldrüsenextraktes.

3. Über die Fettsäuren der Bürzeldrüsen.

De Jonge stellte bereits fest, daß neben einem beträchtlichen Gehalt an höheren Fettsäuren eine geringere Menge niederer Fettsäuren im Bürzeldrüsensekret vorkomme. Ihre Anwesenheit wurde bewiesen durch den niedrigen Schmelzpunkt der Säuren, welche aus den in Äther unlöslichen Bleipflastern gewonnen wurden (Laurostearinsäure und Myristinsäure?), ferner durch die Zusammensetzung der in Äther löslichen Blei- sowie der ihnen entsprechenden Barytsalze. De Jonge scheint hierbei an die Säuren von der Laurinsäure abwärts gedacht zu haben. Denn als die „niederen Fettsäuren" faßt er die mit Wasserdämpfen flüchtigen Säuren auf, deren Menge allerdings, wie seine Beobachtungen zeigen, nur sehr gering war.

Hier war offenbar eine Lücke in den Versuchen von de Jonge, welche ich mich im folgenden auszufüllen bemühte.

Die Lösung der Kaliseifen, welche durch Ausschütteln mit Petroläther vollkommen vom Oktadecylalkohol befreit worden waren (s. o. S. 115), wurde unter Anwendung von Curcumapapier mit Salzsäure neutralisiert und mit Chlorbaryum gefällt. Die Fällung wurde abfiltriert, mit Alkohol gewaschen und 2 bis 3 mal mit Alkohol ausgekocht. Ein Teil der Barytseifen blieb ungelöst (I). Aus den alkoholischen Filtraten schied sich beim Erkalten ein undeutlich kristallinischer Niederschlag ab, der abfiltriert und noch einmal mit Alkohol ausgekocht wurde. Was hierbei ungelöst blieb, wurde mit I vereinigt.

Die alkoholischen Filtrate werden im Vakuum eingedampft und der Rückstand (II) mit Alkohol extrahiert. In Alkohol unlöslich bleiben Chloride u. a. Die alkoholische Lösung wird filtriert, der Alkohol verdunstet und der Rückstand mit Wasser behandelt. Ebenso wird der Rückstand I mit Wasser gewaschen. Mit diesen Waschwässern wird der in Alkohol unlösliche Teil von Rückstand II vereinigt. Man erhält so:

I. Baryumseifen in Alkohol unlöslich,
II. „ „ „ löslich,
III. „ „ Wasser „

Fettsäuren, welche in Wasser lösliche Baryumsalze bilden, enthält das Bürzeldrüsenextrakt nur in sehr geringer Menge. Durch Zerlegen des Wasserextraktes mit Salzsäure und Ausschütteln mit Äther wurde eine Säuremenge gewonnen, welche bei Verarbeitung von 115 g Bürzeldrüsenextrakt nur 0,25 g KOH neutralisierten. Die Kaliseife gab mit Silbernitrat einen Niederschlag, der 43,85 Proz. Ag enthielt. Caprylsaures Silber fordert 43,01 Proz. Ag.

Die in Alkohol unlöslichen Barytseifen (11 g) wurden unter Erwärmen mit Salzsäure zerlegt und die Säuren mit Äther aufgenommen. Der Ätherrückstand war bei Zimmertemperatur fest, etwas schmierig und hatte eine Säurezahl von 205,6. Er wurde mit Kalilauge neutralisiert, die Kaliseifen wurden mit basisch essigsaurem Blei gefällt, die Bleiseifen abfiltriert, mit Wasser gewaschen, im Leuchtgasstrome getrocknet und mit Äther extrahiert. Ein Teil löste sich, ein Teil blieb ungelöst.

Die in Äther unlöslichen Bleiseifen wurden mit Salzsäure zerlegt, die Säuren in Äther gelöst; der Ätherrückstand war fest, weiß und kristallinisch.

Durch fraktionierte Kristallisation ließ er sich zerlegen in

Fr. I. 1,3 g Schmp. 52 bis 53°, Säurezahl 215,1,
Fr. II. 0,45 g Schmp. 52 bis 53°, unterhalb 52° erweichend, Säurezahl 220,2.
Fr. III. 0,4 g „ 50 bis 51° „ 51° „ „ 213,4.

Von den Säuren, welche in den in Äther unlöslichen Bleisalzen enthalten sein könnten, schmilzt Laurinsäure bei 43,6°, Myristinsäure bei 53,8°, Palmitinsäure bei 62,0°, Stearinsäure bei 69,2°; Gemische von Palmitin- und Stearinsäure schmelzen bei 55,1° und höher.

Die Säurezahlen, d. h. die Menge Kaliumhydroxyd in Milligrammen, welche 1 g Säure neutralisiert, sind für Laurinsäure 280, Myristinsäure 245, Palmitinsäure 215, Ölsäure 198,5, Stearinsäure 197.

Vergleicht man mit diesen Zahlen die gefundenen Werte, so wird es wahrscheinlich, daß die Fraktion der Fettsäuren, welche in Alkohol unlösliche Baryt- und in Äther unlösliche Bleisalze bilden, aus einem Gemisch von Stearinsäure, Palmitinsäure und, wie auch de Jonge vermutete, Säuren von kleinerem Molekulargewicht (Myristin- und Laurinsäure?) bestand, vielleicht auch kleine Mengen von Ölsäure enthielt, deren Bleisalz der Lösung mit Äther entgangen war.

Die in Äther löslichen Bleiseifen wurden ebenfalls mit Salzsäure zerlegt. Die Säuren wurden in Äther aufgenommen. Nach Verdunsten des Äthers wurde der Rückstand in Alkohol gelöst und mit Baryumazetat fraktioniert gefällt. Fraktion I bildete einen zähen Niederschlag, der nach dem Auskochen mit Alkohol 18,41 Proz. Baryum enthielt. Fraktion II war weißflockig, zum Teil kristallinisch und enthielt 18,51 Proz. Baryum. Ölsaures Baryum fordert 19,65 Proz. Nach Abfiltrieren von Fraktion II erfolgte bei Zusatz von Baryumazetat keine Fällung mehr.

Aus Fraktion I und II wurde die Säure in Freiheit gesetzt. Sie bildete ein Öl, welches in der Kälte strahlig kristallinisch erstarrte, bei + 8 bis 9° C schmolz und eine Säurezahl von 199,0 hatte, das Kaliumsalz kristallisierte aus Alkohol in weißen Warzen. Diese Säure war jedenfalls in der Hauptmenge Ölsäure.

Aus Fraktion III schied sich bei Zusatz von Wasser ein Baryumsalz ölig ab, aus dem durch Zerlegen mit Salzsäure und Schütteln mit Äther die Säuren gewonnen wurden. Sie wurden mit alkoholischer Kalilauge annähernd neutralisiert und mit Silbernitrat fraktioniert gefällt. Die Fällung, die neben dem Silbersalz noch Kaliumnitrat enthielt, wurde mit Wasser gewaschen, in Äther gelöst und mit Alkohol gefällt. Fr. I —, Fr. II 30,8 Proz. Ag., Fr. III 30,8 Proz. Ag.

Ölsaures Silber fordert 27,7 Proz., myristinsaures Silber 32,2 Proz., laurinsaures Silber 32,6 Proz. Ag.

Neben der Ölsäure kann also in den ätherlöslichen Bleisalzen auch eine Säure vom Molekulargewicht der Myristinsäure und Laurinsäure vorhanden gewesen sein.

Die in Alkohol löslichen Barytseifen wurden wieder mit Salzsäure zerlegt. Die Säuren wurden mit Äther aufgenommen. Der Ätherrückstand war ölig und blieb es auch, als er mit

Kristallen von Laurinsäure und Myristinsäure geimpft im Kühlen längere Zeit stand.

Die wässerige Lösung des Kaliumsalzes wurde in 10 Fraktionen mit Silbernitrat gefällt; die Fällung mit Wasser gewaschen, in Äther gelöst, mit Alkohol gefällt und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

Fraktion I enthielt 31,9 Proz. Ag, Fraktion VI ebenfalls 31,9 Proz. Ag, Fraktion X 32,2 Proz. Ag. Die Zusammensetzung des Silbersalzes stimmt genau zur Myristinsäure; die aus dem Silbersalz gewonnene Säure blieb aber ölig.

In einer anderen Versuchsreihe wurde sowohl das aus den in Alkohol unlöslichen wie das aus den in Alkohol löslichen Baryumsalzen gewonnene Säuregemisch der fraktionierten Destillation bei vermindertem Drucke unterworfen.

Die Säuren aus den in Alkohol unlöslichen Barytseifen beginnen unter einem Druck von 30 bis 40 mm Hg bei 183° zu destillieren. Es wurde aufgefangen Fr. I bei 190 bis 195°, Fr. II bei 195 bis 200, Fr. III bei 200 bis 207, Fr. IV bei 207 bis 220, Fr. V bei 220 bis 230°. Bis 230° war etwa die Hälfte abdestilliert.

Palmitinsäure siedet unter einem Druck von 15 mm Hg bei 215° C.

Reine Ölsäure von Kahlbaum begann unter einem Druck von 50 bis 60 mm Hg bei 258 bis 262° C zu destillieren, aus der ersten Fraktion schied sich sehr bald ein kristallinischer Niederschlag ab, bei 262 bis 264° ging ein farblos Destillat über, dessen Säurezahl 198,2 bis 198,9 war. Ölsäure, die aus dem in Äther löslichen Bleisalz der Fettsäuren von Gänsefett erhalten worden war, begann unter einem Druck von etwa 20 mm Hg bei 221 bis 226° zu destillieren; die Säurezahl war 198,4; bei 226 bis 227,5° war die Säurezahl 198,9, bei 227 bis 228° 198,0.

Wenn also die Säuren aus den unlöslichen Barytseifen schon bei 190° destillierten, so spricht dies wieder dafür, daß unter ihnen Säuren mit weniger Kohlenstoffatomen als Palmitinsäure vorhanden waren, was mit den anderen oben angeführten Beobachtungen übereinstimmt.

Die Säuren aus den löslichen Barytseifen zeigten folgendes Verhalten. Es destillierte unter einem Drucke von etwa 30 mm Hg

Fraktion	I	bei	175—177°	0,525 g	Säurezahl	255,2
„	II	„	178—180°	0,77 g	„	250,0
„	III	„	180—182°	1,11 g	„	245,5
„	IV	„	182—184°	0,88 g	„	245,1
„	V	„	über 184°	0,74 g	„	238,5

Fraktion II zeigte kein Jodbindungsvermögen. Die Elementaranalyse ergab:

73,26 Proz. C und 12,39 Proz. H
$C_{14}H_{28}O_2$ fordert 74,12 Proz. C, 12,28 Proz. H
$C_{12}H_{24}O_2$ „ 72,00 „ C, 12,00 „ H.

Siedepunkt, Säurezahl und elementare Zusammensetzung stimmen zu der Annahme, daß die zuerst übergehenden Fraktionen ein Gemisch von Laurin- und Myristinsäure waren. Die zuletzt siedenden Fraktionen enthielten bereits geringe Mengen von Ölsäure. Hierauf deutete das Sinken der Säurezahl, außerdem besaßen die letzten Fraktionen ein deutliches Jodbindungsvermögen.

Trotzdem konnte ein Gemenge von Myristinsäure und Laurinsäure nicht vorliegen. Denn Laurin- und Myristinsäure, ebenso wie Gemische beider sind bei Zimmertemperatur fest, die abdestillierten Säurefraktionen aber waren flüssig und blieben es auch nach dem Impfen mit Laurin- und Myristinsäure. Eine Beimengung von Ölsäure war es nicht, die die Kristallisation verhinderte, denn auch die Fraktionen, die kein Jodbindungsvermögen besaßen, kristallisierten nicht.

Eine weitere Untersuchung des Säuregemisches zeigte nun, daß es optisch aktiv war und zwar besaß es in Aceton gelöst ein Drehungsvermögen von $[\alpha]$ D — 25,9 bis 26,3°.

Die Säuren, welche in Alkohol lösliche Baryumsalze und in Äther lösliche Blei- und Silbersalze bildeten, sind also anscheinend Isomere der Laurin- und Myristinsäure. Zu einer Trennung beider Säuren und ihrer genauen Identifizierung reichten die mir zur Zeit zur Verfügung stehenden Mengen nicht aus.

4. Über den Fettgehalt der Bürzeldrüse.

Wer das Extrakt der Bürzeldrüsen sieht, sich von seiner Unlöslichkeit in Wasser, seiner Löslichkeit in Äther usw. überzeugt hat, wird leicht geneigt sein, anzunehmen, daß der wesentliche Bestandteil dieses Extraktes Fett ist. Nachdem aber nachgewiesen worden war, daß das Bürzeldrüsenextrakt sehr große Mengen Oktadecylalkohol enthält und von Säuren überwiegend solche, welche bei Zimmertemperatur ölig sind, so war mit der Möglichkeit zu rechnen, daß das Extrakt der Bürzeldrüsen vielleicht nur aus Estern des Oktadecylalkohols besteht. Es erschien deshalb nicht überflüssig, direkt den Nachweis von Fetten d. h. von Glyzerinestern zu erbringen.

Zum Nachweis von Glyzerin wurden 50 g des Bürzeldrüsenextraktes mit 500 ccm Alkohol und 20 g Kaliumhydroxyd

1 Stunde auf dem Wasserbade am Rückflußkühler gekocht. Die Flüssigkeit wurde mit Salzsäure annähernd neutralisiert. Der Alkohol wurde zum größten Teil abdestilliert, die Seifen mit Kochsalz abgeschieden. Letztere wurden unter Absaugen mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Das Filtrat und die Waschwässer wurden eingedampft und mit Alkohol extrahiert. Zur weiteren Entfernung der Seifen wurde der Alkoholrückstand mit Chlorbaryum und Alkohol versetzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert; beim Verdunsten des Alkohols blieb eine sirupöse Flüssigkeit, welche beim Erhitzen mit Kaliumbisulfat Akroleinreaktion gab, d. h. Dämpfe, welche einen mit ammoniakalischer Silberlösung getränkten Papierstreifen schwärzten. Sie gab ferner die Reichlsche Reaktion*): „2 Tropfen Glyzerin, 2 Tropfen geschmolzenes Phenol und ebensoviel Schwefelsäure werden sehr vorsichtig etwas über 120° erhitzt, wobei sich in der harzigen Schmelze bald eine braune feste Masse bildet, die sich nach dem Abkühlen mit prachtvoll karmoisinroter Farbe in Ammoniak löst; oder: kocht man eine kleine Menge der auf Glyzerin zu prüfenden Substanz mit wenig Pyrogallol und mehreren Tropfen einer mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnten Schwefelsäure, so färbt sich die Flüssigkeit bei Gegenwart von Glyzerin deutlich rot, nach Zusatz von Zinnchlorid violettrot“.

Die quantitative Bestimmung des Glyzerins erfolgte nach der Methode von Benedikt-Zsigmondy**).

Mit dieser wurden in 100 g Bürzeldrüsenextrakt 2,4 bis 5,1 Proz. Glyzerin gefunden.

Es ist dies nur etwa ein Viertel bis ein Halb von der Menge Glyzerin, die im Unterhautfettgewebe der Gans enthalten ist. In diesem bestimmte ich die Menge des Glyzerins zu 11,7 Proz.

Im Bürzeldrüsenextrakt sind also zwei Alkohole enthalten, das Glyzerin und der Oktadecylalkohol, an welche sämtliche Fettsäuren esterartig gebunden sein müssen. Denn freie Fettsäuren kann es nicht enthalten, da es frisch annähernd neutral reagiert. Es fragt sich nun weiter: wieviel von den Fettsäuren sind an Glyzerin, wieviel an Oktadecylalkohol gebunden?

Als Maß für die Menge der Fettsäuren dient uns die Verseifungszahl. Sie drückt die Menge Fettsäuren aus durch die ihr gleichwertige Menge Kaliumhydroxyd. Es wurde z. B. gefunden die Verseifungszahl 136,5, d. h. die Gesamtmenge der Fettsäuren,

*) Benedict-Ulzer, Analyse der Fette und Wachsarten. Berlin 1897. S. 34.

**) Ebenda S. 182.

die in 100 g Bürzeldrüsenextrakt vorhanden waren, wurde neutralisiert durch 13,65 g KOH. Glyzerin enthielt dieses Extrakt 5,05 g. Die Menge Fettsäuren, die mit ihm verbunden ist, läßt sich ebenfalls durch die Kaliäquivalente ausdrücken. Da Glyzerin, $C_3H_5(OH)_3$, drei Hydroxylgruppen enthält, deren Wasserstoffatome durch Säureradikale ersetzt werden können, so ist ein Molekül Glyzerin gleichwertig 3 Molekülen Kaliumhydroxyd oder 92 Gewichtsteile Glyzerin entsprechen 168 Gewichtsteilen Kaliumhydroxyd, also 5,05 g Glyzerin 9,22 g Kaliumhydroxyd. Von den 13,65 g Kaliumhydroxyd, welche bei der Verseifung des Bürzeldrüsenextraktes durch die Fettsäuren gebunden werden, waren also $100 \times 9,22 / 13,65$, d. h. 67,5 Proz. der Fettsäuren, ausgedrückt in äquivalenten Mengen Kaliumhydroxyd, in Fetten enthalten und 32,5 Proz. in Oktadecylestern.

Viel geringer war die Menge des Fettes in dem flüssig bleibenden Teile eines anderen Bürzeldrüsenextraktes. Die Verseifungszahl war 135,6; die Menge des Glyzerins 2,57 Proz. Dieser entsprechen 4,69 g Kaliumhydroxyd, von den Fettsäuren waren also 34,6 Proz. in Triglyzeriden enthalten.

In demselben Extrakt wurde die Menge des Oktadecylalkohols zu 43,5 Proz gefunden. Da ein Molekül (270 g) Oktadecylalkohol sich mit einem Molekül Fettsäure, das 56 g Kaliumhydroxyd äquivalent ist, zum Ester verbindet, so entsprechen 43,5 g Oktadecylalkohol $43,5 \times 56 / 270 = 9,02$ g Kaliumhydroxyd. Die Differenz zwischen der Verseifungszahl und dem Glyzerinäquivalent war 8,87.

Die Menge des Oktadecylalkohols reicht also aus, um alle nicht an Glyzerin gebundenen Fettsäuren esterartig zu binden.

Berücksichtigt man, daß das Molekulargewicht des Oktadecylalkohols dreimal so groß als das des Glyzerins ist, so sieht man, daß der größere Teil des Bürzeldrüsenextraktes nicht aus Fett, sondern aus den Estern des Oktadecylalkohols besteht. Er enthält weder freie Fettsäuren in nennenswerter Menge noch freien Oktadecylalkohol.

Da die verschiedenen Fettsäuren in mannigfacher Weise am Glyzerin und Oktadecylalkohol gebunden sein können, so ist die Zahl der Verbindungen, welche im Bürzeldrüsenauszuge enthalten sein können, eine sehr große und auf jeden Fall so groß, daß eine Trennung dieser Verbindungen, z. B. durch fraktionierte Kristallisation in der Kälte, außerordentlich schwierig, wenn nicht überhaupt aussichtslos erscheint.

B. Die in Äther löslichen Bestandteile des Bürzeldrüsensekretes.

Der Ätherauszug des Bürzeldrüsensekretes unterscheidet sich äußerlich nicht wesentlich von dem des Bürzeldrüsenextraktes. Er bildet meist ein vielleicht etwas dunkler gefärbtes Öl, das sich beim Stehen ebenfalls in zwei Schichten scheidet, in ein klares Öl und einen festeren abfiltrierbaren Anteil.

De Jonge gibt an, daß das Sekret stets saure Reaktion zeige. Die Azidität hat er nicht bestimmt. Ich fand bei Verarbeitung einer größeren Menge Sekret, das unmittelbar nach dem Ausdrücken in Alkohol übertragen worden war, für den Ätherextrakt eine Säurezahl von 0,69.

Das frische, unzersetzte Sekret ist also als annähernd neutral zu betrachten. Im Gegensatz zur Angabe von de Jonge und den herrschenden Ansichten über die Reaktion des Sekrets der Talgdrüsen enthält es keine nennenswerten Mengen von freien Fettsäuren. Es scheint aber, als ob Fettsäuren allmählich durch Zersetzung des Sekrets entstehen könnten. So hatte ein Sekret, das längere Zeit in einem locker zugekorkten Gefäß aufbewahrt worden war, eine Säurezahl von 12,4.

Das Sekret enthält dieselben Fettsäureester des Glyzerins und des Oktadecylalkohols wie das Bürzeldrüsenextrakt. Das alkoholfreie Fettsäuregemisch dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach links und bindet Jod.

Unterschiede zwischen dem Sekret und dem Extrakt der Bürzeldrüse zeigen sich in bezug auf das Mengenverhältnis von Fett und Oktadecylestern. Es wurde das Extrakt und das Sekret untersucht, welches aus mehr als hundert Drüsen gewonnen worden war und zwar I. das Gesamtextrakt, II. der gelöst bleibende Anteil desselben.

Extrakt, Verseifungszahl 138,4, Jodzahl 15.5, Menge d. Oktadecylalkohols 44,7 Proz.

Sekret, Verseifungszahl 127.5, Jodzahl 5.5, Menge d. Oktadecylalkohols 54,6 Proz.

Extrakt, flüssiger Teil, Verseifungszahl 135.5, Jodzahl 20.0, Menge des Oktadecylalkohols 43.5 Proz.

Sekret, flüssiger Teil, Verseifungszahl 128.3, Jodzahl 8.0, Menge des Oktadecylalkohols 49.4 Proz.

Die Menge des Oktadecylalkohols ist im Sekret größer als im Extrakt. Dagegen ist die Menge des Fettes im Sekret geringer. Es ergibt sich dies aus folgender Rechnung. Die Kaliäquivalente, die der Menge des Oktadecylalkohols entsprechen, sind für 1 g Bürzeldrüsenextrakt 90,2 bzw. 92,7 mg, für 1 g Sekret 102 bzw. 113 mg. Es bleiben also für die Triglyzeride im Extrakt



45, im Sekret 26 bzw. 14 Kaliäquivalente, d. h. im Extrakt sind von den Fettsäuren 33 Proz., im Sekret nur 11 bis 14,4 Proz. an Glyzerin gebunden.

II. Über die Bildung des Bürzeldrüsensekrets.

1. Die Oktadecylester entstehen aus Fett.

Die Abnahme des Fettes im Bürzeldrüsensekrete und die gleichzeitige Zunahme der Oktadecylester sind uns der sichere Beweis dafür, daß Fett das Material ist, aus welchem sich letztere bilden. Es läßt sich dies ungezwungen in folgender Weise erklären:

Aus den Fetten entstehen, vermutlich durch fermentative Spaltung, die Fettsäuren und Glyzerin. Von ersteren gehen Ölsäure und Stearinsäure durch Reduktion in Oktadecylalkohol über.

$$\underset{\text{Ölsäure}}{C_{18}H_{34}O_2} + H_2 = \underset{\text{Stearinsäure}}{C_{18}H_{36}O_2}$$

$$\underset{\text{Stearinsäure}}{C_{18}H_{36}O_2} + 2H_2 = \underset{\text{Oktadecylalkohol}}{C_{18}H_{38}O} + H_2O$$

In Übereinstimmung hiermit steht das Verhalten der Jodzahl. Die Jodzahl, welche uns eine Vorstellung von der Menge der Ölsäure gibt, ist im Bürzeldrüsenextrakte kleiner als in den Fetten und zwar auch dann, wenn wir sie auf alkoholfreie Fettsäuren beziehen. Noch viel kleiner ist sie im Sekret. Bei der Bildung des Sekrets, d. h. mit der Bildung des Oktadecylalkohols, verschwindet Ölsäure.

Verwickelter sind anscheinend die Vorgänge, welche zur Bildung der optisch aktiven Säuren $C_{12}H_{24}O_2$ und $C_{14}H_{28}O_2$ führen. Da sie nur aus Ölsäure, $C_{18}H_{34}O_2$, Stearinsäure, $C_{18}H_{36}O_2$ und Palmitinsäure, $C_{16}H_{32}O_2$, entstanden sein können, setzt ihre Bildung einen oxydativen Abbau voraus:

$$CH_3 . CH_2 \ldots COOH + 3\,O = CH_3 \ldots COOH + CO_2 + H_2O.$$

Derselbe kann nur, wie man sieht, unter Aktivierung von Sauerstoff erfolgen.

Das Nebeneinandervorkommen von Reduktion — Bildung von Oktadecylalkohol — und Oxydation — Bildung der kohlenstoffärmeren Fettsäuren — läßt hier wie auch an anderen Orten auf eine Abhängigkeit beider Vorgänge voneinander schließen.

Da ferner die erwähnten Säuren optisch aktiv sind, müssen sie ein oder mehrere asymmetrische Kohlenstoffatome enthalten. Die Kohlenstoffatome müssen tertiär oder quaternär miteinander verbunden sein. Die Oxydation muß also gleichzeitig zu einer Synthese führen.

Eine weitere Synthese ist die Bildung der Ester aus dem Oktadecylalkohol und den Fettsäuren.

Doch damit noch nicht genug. Nur kurz wurde bisher ein Bestandteil des Bürzeldrüsensekretes erwähnt, der in Äther unlöslich und Chloroform löslich ist und noch nicht weiter untersucht wurde. Auch er bildet sich, wie ich Grund habe anzunehmen, aus den Fetten.

Dies alles ist von Interesse, nicht nur weil es uns zeigt, wie das Sekret der Bürzeldrüse entsteht, es ist auch von allgemeinerer Bedeutung, weil es uns einen bisher allerdings noch unvollkommenen Einblick in einen „Sekretionsvorgang“ gewährt und wenigstens für den vorliegenden Fall beweist, daß mit demselben chemische Prozesse mannigfacher Art verbunden sind.

2. Das Fett, aus dem das Sekret der Bürzeldrüse entsteht, bildet sich nicht durch „Verfettung“ der Drüsenzellen.

Die chemische Untersuchung der Bürzeldrüse und ihres Sekrets und die Vorstellung, die wir uns auf Grund derselben von der Bildung des Sekrets gemacht haben, zwingt uns, der eingangs gestellten Frage eine etwas andere Form zu geben. Fett bildet unter Umständen nur einen recht kleinen Teil des Bürzeldrüsensekrets. Seine Hauptmenge besteht aus Stoffen, von denen wir uns, wie wir soeben sahen, leicht vorstellen können, daß sie aus Fett entstehen, die aber, so sehr sie auch äußerlich dem Fette gleichen, doch nicht Fette, d. h. die Triglyceride der Fettsäuren sind. Wir können also nicht mehr fragen, geht Nahrungsfett in das Sekret der Bürzeldrüsen über? Wir müssen fragen: Tritt Fett als Material für das zu bildende Sekret in die Bürzeldrüsen ein oder wird Fett in der Bürzeldrüse selbst etwa durch Zerfall von Eiweiß, wie man bisher annimmt, gebildet? Die Antwort auf diese Frage geben die folgenden zum Teil von Plato angestellten Versuche.

Gänse wurden in geeigneten Zwangsställen so gehalten, daß sie mit ihrem Schnabel nicht zu den Bürzeldrüsen gelangen konnten. Sie hungerten zunächst einige Tage und erhielten noch eine weitere Reihe von Tagen ein fettfreies Futter in unzureichender Menge. Als solches diente Gerstenschrot, das im Mürrleschen Extraktionsapparate durch Äther von Fett und anderen in Äther löslichen Stoffen befreit worden war. Durch Anrühren mit etwas heißem Wasser wird die Masse plastisch und läßt sich in Nudeln formen, die, bei gelinder Wärme getrocknet, längere Zeit haltbar sind. War eine entsprechende Gewichtsabnahme erfolgt, so erhielten die Gänse Nudeln, denen eine gewisse Menge desjenigen Fettes zugesetzt worden war, dessen Übergang in das Sekret der Bürzeldrüsen festgestellt werden sollte. Mit diesen Nudeln wurden die Gänse in solchen Mengen gestopft, daß das Nahrungsbedürfnis mehr als



gedeckt war. Das Stopfen geschah dreimal im Laufe des Tages, es muß vorsichtig gemacht werden, damit keine Entzündung des Schlundes und Kropfes eintritt. Wasser erhielten die Tiere nach Belieben. Nachdem die Gänse längere Zeit in dieser Weise gefüttert worden waren, wurden sie geschlachtet, und untersucht, ob ein Übergang des gefütterten Fettes in die Bürzeldrüse nachzuweisen war.

Zu den Versuchen, durch welche der Übergang des Nahrungsfettes in das Fettgewebe bewiesen wurde, sind bisher drei Fette benutzt worden: das Leinöl, das Hammelfett und das Palmin. Als besonders geeignet erwies sich uns für unsere Versuche das Sesamöl. Es bietet den außerordentlich großen Vorteil, daß es einen von den Schalen der Sesamkörner herstammenden Stoff enthält, der durch eine Reihe sehr empfindlicher Reaktionen*) charakterisiert ist, u. a. durch die folgende von V. Villavecchia und G. Fabris angegebene Reaktion, die auf Beobachtungen Baudouins fußt: Sesamöl, das mit einigen Tropfen einer 1proz. Lösung von Furfurol in 94proz. Alkohol und Salzsäure (spez. Gew. 1,125) geschüttelt wird, färbt sich stark blaurot. Durch diese Reaktion ist von A. Scheibe und anderen**) nachgewiesen worden, daß in die Milch von Kühen, die mit Sesamkuchen gefüttert werden, Sesamöl übergeht.

In einer ersten Versuchsreihe hungerten fünf Gänse 8 Tage, sie erhielten in allmählich steigenden Mengen entfettetes Schrotmehl, dem für den Tag 20 g Sesamöl zugesetzt worden waren. Fünf andere Gänse wurden in gleicher Weise behandelt, sie erhielten die gleiche Menge Palmin.

Verhalten des Körpergewichts (Kilogramm).

1900	I.	II.	III.	IV.	V.	
20. 10.	2,85	2,80	3,30	2,80	3,02	Hunger
27. 10.	2,30	2,32	2,70	2,25	2,50	
18. 11.	2,89	2,80	3,30	2,75	2,80	Sesamfütterung
26. 11.	3,25	3,30	3,80	3,10	3,18	
8. 12.	3,50	3,50	3,90	3,40	3,45	
17. 12.	geschlachtet					
22. 10.	2,34	2,40	2,83	2,49	2,51	Hunger
29. 10.	1,97	2,03	2,21	1,98	1,96	
22. 11.	2,86	3,16	3,13	2,83	2,42	Palminfütterung
6. 12.	2,77	3,60	3,62	3,46	3,08	
17. 12.	geschlachtet					

*) s. Chem. Centralbl. 1897, 1, 521, 619; 2, 772. 1898, 2, 1108, 679. 1899, 1, 68; 2, 228, 729.

**) Chem. Centralbl. 1898, 1, 147; 2, 1108.

Durch den Hunger wurde der Fettbestand vermindert, das Körpergewicht sank. Unter dem Einfluß der Fütterung nahm es sowohl bei den mit Sesamöl, wie bei den mit Palmin gefütterten Gänsen zu, die Gänse setzten bedeutende Mengen von Fett an. Nachdem die Gänse 47 bzw. 45 Tage gefüttert worden waren, wurden sie geschlachtet. Das Körpergewicht, welches sie am Ende der Fütterung besaßen, wurde leider nicht notiert. Die Bürzeldrüsen wurden herauspräpariert, das Sekret wurde ausgedrückt und dieses sowie die Bürzeldrüsen selbst in der oben beschriebenen Weise extrahiert. Auch aus dem Fettgewebe wurden Proben genommen. Aus diesen wurde das Fett ausgeschmolzen und untersucht, ob und wie weit das gefütterte Fett im Fettgewebe zur Ablagerung gelangt war.

Die Ablagerung von Sesamöl im Fettgewebe der mit Sesamöl gefütterten Gänse ließ sich in außerordentlich einfacher und anschaulicher Weise zeigen durch die intensive Rotfärbung, welche in kürzester Zeit eintrat, wenn man eine kleine Probe des Fettes mit rauchender Salzsäure und Furfurollösung schüttelte.

Ein Vergleich der Schmelzpunkte der Fettsäuren, der Jod- und Verseifungszahlen von den gefütterten Fetten mit denen des Fettgewebes zeigt folgendes:

	Schmelzpunkt der Fettsäuren	Jodzahl	Verseifungszahl	
Sesamöl	24—26	108—111	187—193	gefütterte Fette
Palmin	25—28	8—17	257—268	
Sesamölfütterung .	34—36,5	63,2	208	Fett d. Fettgewebes
Palminfütterung .	38—41	39,6	218	

Die Unterschiede in der Zusammensetzung des Fettes im Fettgewebe liegen nach derselben Richtung wie die Unterschiede der gefütterten Fette. Bei Sesamölfütterung ist der Schmelzpunkt der Fettsäuren und die Verseifungszahl niedriger, die Jodzahl höher als bei Palminfütterung.

Die Zahlen beweisen andererseits, daß nur ein Teil des Körperfettes aus dem gefütterten Fett herstammt. Hält man sich an die Jodzahlen, so besteht das Körperfett höchstens zur Hälfte aus Sesamöl bzw. Palmin. Sicherlich waren durch den achttägigen Hunger zu Beginn der Versuchsreihe die Fettdepots nur zum Teil entleert worden, vielleicht hatte sich auch aus den in reichlicher Menge gefütterten Kohlenhydraten Fett gebildet.

Bei der Untersuchung des Bürzeldrüsenextraktes wurden folgende Zahlen gefunden:

	Jodzahl		Verseifungszahl
	des Extrakts	der Fettsäuren	
Sesamölfütterung . .	22,1	52,3	188,7
Palminfütterung . .	18,8	33,9	174,9

Auch in den Bürzeldrüsen finden sich Unterschiede in der Zusammensetzung des Ätherextraktes, welche auf eine Beziehung zur Beschaffenheit des gefütterten Fettes hindeuten. Die Jodzahl ist größer, die Verseifungszahl kleiner bei Sesamfütterung als bei Palminfütterung.

Ganz unzweideutig wurde der Übergang von Nahrungsfett in die Bürzeldrüsen dadurch bewiesen, daß der Bürzeldrüsenextrakt der mit Sesamöl gefütterten Gänse sich beim Schütteln mit Salzsäure und Furfurol stark rot färbte. Bei den mit Palmin gefütterten Gänsen blieb die Reaktion selbstverständlich aus.

Aber nicht nur das Fett, welches als solches in der Nahrung enthalten ist, auch das Fett, das sich im Organismus aus Kohlenhydraten bildet, kann in die Bürzeldrüse eintreten. Es ist dies von vorne herein sehr wahrscheinlich, da dieses Fett nach den von mir und Lummert*) ausgeführten Versuchen ebenfalls nur aus den Triglyzeriden der Ölsäure, Stearinsäure und Palmitinsäure besteht.

Zwei magere Gänse hungerten 9 Tage und erhielten dann in allmählich steigenden Mengen Nudeln aus entfettetem Gerstenschrot, die in heißem Wasser kurze Zeit gekocht worden waren. Das Körpergewicht sank während des Hungers bei Gans I von 2,9 auf 2,5 kg, bei Gans II von 2,75 auf 2,45 kg. Es stieg innerhalb der 20 Fütterungstage bei Gans I auf 4,1, bei Gans II auf 3,65 kg. Von dem Gerstenschrot war an jede Gans 6750 g verfüttert worden. Da dasselbe, wie nachträglich festgestellt wurde, noch 0,44 Proz. in Äther lösliche Bestandteile enthielt, so konnten die Gänse höchstens 25 g Fett in der Nahrung resorbiert haben.

Das Hautfett war weiß und bei Zimmertemperatur fest. Es schmolz bei 36 bis 40°. Die Verseifungszahl war 198,9, die Jodzahl 57,2. Das Fett mußte hiernach verhältnismäßig viel Stearinsäure enthalten**).

*) Pflüg. Arch. 71, 176 (1898).

**) Vgl. G. Rosenfeld, Berl. klin. Wochenschr. 1899, Nr. 30.

Das Gewicht der Bürzeldrüsen betrug bei Gans I 7,15 g, bei Gans II 7,25 g. Die Drüsen waren also groß und reichlich mit Sekret erfüllt.

Zum Vergleich mögen die Gewichte der Bürzeldrüsen von zwei anderen Gänsen angeführt werden, von denen die eine starb, nachdem sie sieben Tage gehungert und sechs Tage mit Gerstenschrot und wenig Sesamöl gefüttert worden war, die andere, nachdem sie ebenfalls sieben Tage gehungert und zehn Tage in gleicher Weise gefüttert worden war. Das Körpergewicht war bei ersterer von 2,85 auf 2,05, bei letzterer von 3,15 auf 2,33 kg gesunken. Die Bürzeldrüse der ersteren wog 1,1 g, die der letzteren 1,55 g.

Aus den Drüsen der beiden mit entfettetem Gerstenschrot gefütterten Gänse wurden zusammen 3,07 g in Chloroform lösliche Bestandteile erhalten, von denen 2,86 g in Äther löslich waren. Die Jodzahl war 9,3, also ebenso wie die des Hautfettes niedrig, die Verseifungszahl 143,9, die Menge des Oktadecylalkohols 44,8 Proz.

Man sieht aus diesen Zahlen zugleich, innerhalb wie weiter Grenzen das Gewicht der Bürzeldrüsen schwanken kann und wie groß die Menge des Sekrets ist, das sich in ihnen anhäuft.

3. Einfluß der Beschaffenheit des Fettes auf die Bildung des Sekrets.

Für die Sekretbildung ist es nun weiter anscheinend nicht gleichgültig, was für eine Beschaffenheit das Fett hat, welches der Drüse zur Verfügung steht. Es fiel uns auf, daß bei den mit Sesamöl gefütterten Gänsen viel mehr Sekret durch Ausdrücken zu gewinnen war als bei den mit Palmin und den nur mit entfettetem Gerstenschrot gefütterten. Für eine stärkere Sekretbildung bei Sesamölfütterung sprach auch der größere Gehalt der Drüsen an Oktadecylalkohol: nach Fütterung mit Gerstenschrot und Sesamöl 65 Proz., mit Gerstenschrot und Palmin 44 Proz., mit Gerstenschrot allein 45 Proz. Die Ölsäure scheint also die Sekretbildung zu begünstigen. Es würde sich dies nicht nur dadurch erklären, daß Ölsäure ein besonders geeignetes Material für die Sekretbildung ist, sondern vielleicht auch dadurch, daß der Schmelzpunkt der ölsäurereichen Fette ein niedriger ist und die Bedingungen für ihren Eintritt in die Drüse günstigere sind.

4. Über die Geschwindigkeit der Sekretbildung.

Die Bildung des Sekretes aus dem zugeführten Fette geht in der Bürzeldrüse nur sehr langsam vor sich, wie die folgenden von Plato ausgeführten Versuche beweisen.

Drei Gänse wurden mit entfettetem, nicht gekochtem Gerstenschrot (für den Tag 100 bis 150 g) und Sesamöl (20 g) gefüttert. In Zwischenräumen von einigen Tagen wurde durch vorsichtigen Druck auf die Drüse Sekret entleert und mit Salzsäure und Furfurol geprüft. Am fünfzehnten Tage war die Reaktion positiv. Dann wurde den Gänsen das Sesamöl entzogen. Die Reaktion blieb zunächst noch positiv und verschwand zwischen dem elften und neunzehnten Tage nach dem Aussetzen der Ölfütterung. Als die Gänse hierauf wieder Sesamöl erhielten, trat sie zwischen dem zehnten und achtzehnten Tage wieder ein. Es dauert also zehn bis achtzehn Tage, bis das in der Drüse gebildete Sekret im oberen Teile des Ausführungsganges erscheint.

5. Beziehung zwischen chemischem und mikroskopischem Befund.

Auch für die mikroskopische Untersuchung der Bürzeldrüsen erwiesen sich die mitgeteilten Ergebnisse der chemischen Forschung als wichtig. In den Zellen der Bürzeldrüsen und ebenso der menschlichen Talgdrüsen liegen nach den Beobachtungen Platos mäßig stark lichtbrechende Körnchen, welche sich mit Osmium nicht schwärzen. Man sieht sie auf Gefrierschnitten. An Schnitten aber, die auch nach der Behandlung mit Flemmingscher Lösung u. a. von Stücken genommen werden, welche in der üblichen Weise mit Alkohol in steigender Konzentration, dann mit Xylol behandelt und in Paraffin eingebettet wurden, findet man an ihrer Stelle nur Lücken im Protoplasma, es zeigt Wabenstruktur. Plato bezeichnete diese Körnchen als lipophore Körnchen. Sie sind sicherlich nichts anderes als die sich mit Osmium nicht schwärzenden charakteristischen Bestandteile des Bürzeldrüsensekretes, nämlich die Oktadecylester der oben erwähnten niederen gesättigten Fettsäuren bis zur Palmitinsäure einschließlich. Plato beobachtete weiter, daß in den peripheren Zellschichten der Tubuli sich neben den erwähnten „lipophoren" Körnchen, also neben den Sekretbestandteilen, die nicht Fett sind, keine mit Osmium sich schwärzenden Substanzen finden, solche träten aber in Form von Körnchen in um so größerer Menge auf, je mehr man einen Tubulus nach dem Ausführungsgange zu verfolgt. Das Lumen des Tubulus ist von einer die Fettreaktion gebenden Masse erfüllt. Die letztere Beobachtung stimmt damit überein, daß auch das Sekret der Bürzeldrüsen sich mit Osmiumsäure schwärzt. Diese Schwärzung ist nicht bedingt durch die soeben erwähnten Ester des Oktadecylalkohols, sie kann zum Teil herrühren von dem „Chloroformkörper" (vgl. S. 113), denn dieser

schwärzt sich mit Osmiumsäure, wenn auch nur langsam und allmählich, zum Teil rührt sie aber her von den geringen Mengen von Ölsäure, welche nicht der Reduktion zu Oktadecylalkohol anheimgefallen sind.

Auffallend ist es, daß diese Schwärzung sich in den zentralen und nicht in den peripheren Teilen der Drüse zeigt. Denn man müßte doch erwarten, daß da, wo das Fett in die Drüse eintritt — nämlich in der Peripherie — die Osmiumfärbung am stärksten ist. Die Art, wie das Fett in die Drüse hineingelangt, ist aber bisher mikroskopisch noch nicht festzustellen gewesen.

Ich erkläre mir die Beobachtung Platos folgendermaßen. Das Fett gelangt von außen her auf noch näher festzustellendem Wege in gleicher Weise zu allen Zellen der Drüse, um hier in die eigenartigen Stoffe des Sekrets umgewandelt zu werden. Diese Umwandlung geschieht in den verschiedenen Zellen nicht mit gleicher Geschwindigkeit, sie erfolgt schneller in den jungen, nach der äußeren Grenze des Tubulus hin gelegenen, langsamer in den älteren, nach dem Ausführungsgange zu gelegenen Zellen. Letztere gehen allmählich zugrunde, noch bevor alles Fett in die Oktadecylester umgewandelt worden ist.

Die mikroskopische Untersuchung der Bürzeldrüse und nach Platos Beobachtungen auch der Talgdrüse widerlegt die bisher geltende Anschauung, nach welcher das Sekret dieser Drüsen aus dem Protoplasma ihrer Zellen durch „fettige Degeneration“ entstände. Sie steht in voller Übereinstimmung mit der chemischen Untersuchung, welche ergab, daß das Sekret der Bürzeldrüsen nicht Fett ist, sondern ein Gemisch von Estern des Oktadecylalkohols, welches durch leicht verständliche chemische Vorgänge aus Fett entsteht, das der Drüse durch den Blutstrom zugeführt wird.

IX.

Beiträge zur Kenntnis der Blutgerinnung*).

Von Dr. **P. Morawitz,** Assistenzarzt der Klinik.

Aus der medizinischen Universitäts-Klinik zu Tübingen.

In der vorhergehenden Mitteilung**) war gezeigt worden, daß die Prothrombine der verschiedenen Autoren nicht identisch sind, da das Prothrombin Alexander Schmidts***), von mir β-Prothrombin genannt, durch Alkalien und Säuren auch bei Abwesenheit von Ca-Ionen, das Prothrombin von Arthus†) und Pekelharing††), von mir α-Prothrombin genannt, nur durch Ca-Ionen aktiviert werden kann.

Da Alex. Schmidt eine Aktivierung des Prothrombins durch „zymoplastische Substanzen" lehrt, war der Weg der weiteren Untersuchung insofern vorgezeichnet, als es notwendig wurde festzustellen, ob es überhaupt zymoplastische Substanzen außer dem Kalk gibt und auf welche Vorstufe des Thrombins dieselben wirken.

Als wesentlichstes Resultat dieser Untersuchungen stellte sich heraus, daß eine Vorstufe des Fibrinfermentes durch eine in sämtlichen Geweben enthaltene Kinase bei Gegenwart von Kalksalzen aktiviert werden kann. Diese Vorstufe des Fermentes habe ich, da sie mit dem α-Proferment nicht identisch ist, als Thrombogen bezeichnet, die

---

*) Die folgenden Resultate meiner Untersuchungen über die Entstehung des Fibrinfermentes sind an anderer Stelle (Deutsch. Arch. f. klin. Med. **79**, H. 1/2) ausführlicher mitgeteilt. Auf Wunsch des Herausgebers gebe ich hier einen kurzen Bericht für die Leser dieser Zeitschrift, weil sie sich meinen früheren Untersuchungen über das Fibrinferment aufs engste anschließen.

) Diese Beiträge **4, 381.

***) Zur Blutlehre. Leipzig 1892.

†) Zusammenfassendes Referat in „La coagulation du sang". Scientia Nr. 5.

††) Die Bedeutung der Kalksalze für die Blutgerinnung. Festschrift f. Virchow 1891, I.

Kinase als Thrombokinase, da Grund zu der Annahme vorliegt, daß es sich dabei um einen einheitlichen Körper handelt. Der als α-Proferment bezeichnete Körper setzt das Zusammenwirken von Thrombogen und Thrombokinase voraus. Im Gegensatz zur Thrombokinase, die sich in allen von mir untersuchten Geweben fand, fehlt das Thrombogen völlig in blutfreien Organen; über seine Herkunft, soweit sie sich bisher hat sicher stellen lassen, sollen am Schluß einige Worte gesagt werden.

Da es nicht die Absicht sein kann in dieser kurzen Mitteilung die Literatur zu berücksichtigen, sei nur soviel bemerkt, daß die Arbeiten von Wooldridge*), Schmidt**), Conradi***), Fuld†) und Hewlett††) Anhaltspunkte für den einzuschlagenden Weg boten.

1. Versuche am Vogelplasma.

Bekanntlich gerinnt Vogelplasma nicht, wenn es sorgfältig mit einer reinen Kanüle aus dem Gefäß entnommen wird. Die Gerinnung desselben erfolgt aber sofort auf Zusatz einiger Tropfen Gewebssaft. Man nahm daher bisher an, daß der Gewebssaft Ferment oder Proferment enthält. Jedoch vermag der Gewebssaft (es wurde hauptsächlich Lebersaft verwendet) Fibrinogenlösung vom Rinde nicht zum Gerinnen zu bringen, weder mit noch ohne Ca-Ionen, während Gansserum die Fibrinogenlösung prompt koaguliert. Der Gewebssaft enthält mithin kein Ferment oder Proferment, sondern eine Kinase, die eine im Gansplasma enthaltene Vorstufe des Fibrinfermentes, das Thrombogen, aktiviert. Diese Aktivierung findet nur bei Anwesenheit von Ca-Salzen statt und bleibt nach Ausfällung der Kalksalze durch Fluornatrium völlig aus. Jedoch ist Gansplasma für diesen Versuch insofern nicht sehr geeignet, als das Vogelfibrinogen unter dem Einfluß von Fluornatrium allmählich ganz ungerinnbar wird.

Dem Gansserum, das durch langsame spontane Gerinnung des Gansblutes gewonnen wurde, kann durch Zusatz von Gewebssaft eine um das 20 bis 30fach stärkere fermentative Wirkung erteilt werden, es finden sich darin also noch reichliche Mengen Thrombogen. Das Thrombogen hält sich im sterilen Gansplasma ziemlich lange. Nach 6 Tagen war durch Zusatz von Gewebssaft noch schnelle Gerinnung zu erzielen, während Hewlett nach

*) Die Gerinnung des Blutes. Übersetzt von M. v. Frey. Leipzig 1891.
**) a. a. O.
***) Diese Beiträge 1, 136.
†) Diese Beiträge 2, 514.
††) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 49, 307.

14 Tagen durch Ferment gerinnbares Gansplasma mit Gewebssaft nicht mehr koagulieren konnte.

Das sorgfältig gewonnene Gansplasma ist aus sich selbst der Gerinnung nicht mehr fähig, das Gansblut dagegen gerinnt zuweilen bei längerem Stehen auch spontan. Die Gerinnung beginnt dabei im zentrifugierten Blute in der Leukocytenschicht, um nach oben und unten langsam fortzuschreiten.

Man kann sich daher die Vorstellung bilden, daß im Gansblut das Thrombogen entweder gelöst vorhanden ist oder sehr schnell abgegeben wird, während die Thrombokinase von den geformten Elementen in vitro (es kommen dabei wohl wesentlich die weißen Elemente in Betracht) zähe festgehalten wird und nur nach intensiveren Schädigungen (Verdünnen mit Wasser, Anwesenheit von Staub usw.) schnell austritt.

In Berührung mit der Wundfläche gerinnt Vogelblut bekanntlich sehr schnell. Man wird diese Erscheinung nicht allein durch die Abgabe der Kinase aus den Geweben an das Blut erklären können, sondern wohl auch annehmen dürfen, daß die Berührung mit den Geweben die zelligen Elemente des Blutes zu einer beschleunigten Sekretion anregt. Auch dürfte das zuerst geronnene Blut durch seinen Fermentgehalt zur schnelleren Gerinnung des nachströmenden beitragen.

2. Versuche am Säugetierplasma.

Obwohl es wahrscheinlich erschien, daß die Fermentbildung bei den Säugetieren prinzipiell ähnlich verläuft, wie bei den Vögeln, war doch eine besondere Untersuchung notwendig. Dieselbe machte hier insofern größere Schwierigkeiten, als Säugetierblut extravaskulär schnell gerinnt und dadurch eine Trennung der beiden wirksamen Faktoren erschwert wird. Die Versuche konnten daher nur an Plasma vorgenommen werden, das mit gerinnungshemmenden Zusätzen verschiedener Art versehen war*).

a) Fibrinogenlösung gerinnt auch bei Anwesenheit von Ca-Salzen nicht mit Gewebssaft. Abweichungen von diesem Verhalten sind unten erwähnt.

b) Die Gerinnungszeit des Gesamtblutes wird durch Zusatz von Gewebssaft um das 4 bis 5fache abgekürzt. (Vgl. auch Conradi a. a. O.)

*) Die Versuche an Plasma, das durch Auffangen des Blutes in paraffinierten Gefäßen nach Freund (Wiener Med. Jahrbücher 1888, S. 259) gewonnen wurde, sind noch nicht zahlreich genug, um in dieser Mitteilung bereits berücksichtigt zu werden.

c) Peptonplasma gerinnt auf Zusatz von Gewebssaft oft schon in Bruchteilen von Minuten (vgl. auch Wooldridge und Hewlett a. a. O.), während es durch viel Serum nur sehr langsam, durch geringere Mengen gar nicht zum Gerinnen gebracht wird. Fällt man vor Zusatz des Gewebssaftes den Kalk im Plasma aus, so gelingt die Aktivierung nicht mehr, wohl aber kann es noch auf Zusatz von Thrombin gerinnen. Peptonplasma ist jedoch zur sicheren Entscheidung unserer Anschauung insofern nicht sehr geeignet, als es durch verschiedene Maßnahmen aus sich selbst heraus zur Gerinnung gebracht werden kann. Es enthält ein Antithrombin und sämtliche zur Fermentbildung nötigen Substanzen, ohne daß dieselben miteinander reagieren. Leitet man die Reaktion (z. B. durch Essigsäurezusatz) ein, so bildet sich so viel Ferment, daß der Antikörper zur Neutralisation desselben nicht mehr hinreicht. Ob der Antikörper mit dem im zirkulierenden Plasma vorhandenen identisch ist, läßt sich vorerst nicht sagen, ebensowenig, ob er ihn quantitativ an Menge übertrifft.

Das Peptonplasma läßt, wie alle kinasehaltigen Plasmata (z. B. Oxalatplasma), beim Abkühlen einen nukleoproteidhaltigen Niederschlag ausfallen. Derselbe fehlt im Gans-, Blutegel- und Fluoridplasma. (Wooldridge und Fuld a. a. O., Pekelharing*).

d) Blutegelextraktplasma. Blutegelextrakt enthält einen Körper, der in vitro quantitativ Ferment neutralisieren kann. Fängt man Blut in steigenden Mengen des Extraktes auf, so beobachtet man, daß von dem Plasma, das aus sich selbst heraus nicht zum Gerinnen gebracht werden kann, die in geringeren Mengen Extrakt aufgefangenen Proben mit Gewebssaft sehr schnell gerinnen, die in größeren Mengen aufgefangenen dagegen auch auf Zusatz von noch so viel Gewebssaft ungeronnen bleiben. Es erklärt sich diese Erscheinung am leichtesten durch die Annahme, daß das im Plasma enthaltene Thrombogen durch Kinase aktiviert wird. Ist die Menge des gebildeten Thrombins hinreichend, um den Antikörper zu neutralisieren, so tritt Gerinnung ein, im andern Falle bleibt das Plasma flüssig. Das Blutegelblut verhält sich etwas anders als sein Plasma. Doch kann darauf an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden. Nebenbei sei noch bemerkt, daß Versuche am Blutegelextraktplasma mit steigenden Mengen Gewebssaftes ausgeführt eine quantitative Wirkungsweise der Kinase wahrscheinlich machen, falls man nicht annehmen will, daß noch unbekannte Faktoren dazwischentreten. Versetzt man nämlich Blutegelextraktplasma mit steigenden Mengen

*) Untersuchungen über das Fibrinferment. Amsterdam 1892.

Gewebssaft, so gerinnen unter Umständen nur die mit größeren Mengen versetzten Proben, während Proben mit geringeren Mengen Kinase von einer bestimmten Grenze nach abwärts dauernd flüssig bleiben.

e) Fluoridplasma gerinnt nach Ausfällung des Fluornatriums mit Kalk nicht, auch nicht beim Verdünnen mit Wasser. Meist gerinnt das Plasma jedoch bei Anwesenheit von Kalk auf Zusatz von Gewebssaft, jedoch immer langsamer als Blutegel- und Peptonplasma. Je sorgfältiger das Fluoridplasma gewonnen ist, d. h. je weniger verändert das Blut in die Lösung von Fluornatrium einfließt, desto langsamer treten die Gerinnungen mit Gewebssaft ein. In einigen Fällen konnte ich überhaupt keine Gerinnung erzielen. Mithin enthält Fluoridplasma in gewissen Fällen kein Thrombogen, zuweilen jedoch geringe Mengen, eine Tatsache, die dafür spricht, daß Thrombogen sich nicht gelöst im zirkulierenden Plasma findet.

Fluoridblut gerinnt ebenfalls bei Anwesenheit von Kalksalzen nicht oder nur sehr langsam. Die Gerinnung erfolgt jedoch auf Zusatz von destilliertem Wasser oder Gewebssaft außerordentlich schnell.

Fluornatrium hemmt also die Gerinnung in doppelter Weise, erstens durch Kalkfällung und zweitens durch Verhinderung der Abgabe der Fermentvorstufen, besonders der Kinase. In letzterer Beziehung ist die Wirkung ähnlich wie beim Blutegelextrakt und offenbar als Giftwirkung resp. Lähmung der sekretorischen Funktion der Zellen aufzufassen.

f) Serum kann ebenfalls durch Zusatz von Kinase bei Anwesenheit von Kalksalzen aktiviert, d. h. seine fermentative Wirkung um das 20 bis 40fache (bestimmt nach der Gerinnungszeit) gesteigert werden. Vorherige Ausfällung des Kalks verhindert die Wirkung vollständig, fällt man den Kalk nach kurzer Einwirkung der Kinase auf das Serum aus, so ist dagegen ein aktivierender Einfluß deutlich nachweisbar. Wir werden daher annehmen, daß im Serum noch Thrombogen vorhanden ist, das bei der normalen Blutgerinnung nicht aktiviert wurde. Das Thrombogen hat mit dem β-Proferment nichts zu tun, wofür schon die Notwendigkeit der Anwesenheit von Ca für die Aktivierung des Thrombogens spricht, ebenso wie der Umstand, daß man nach vollständiger Aktivierung des Serums durch Kinase, wenn der Fermentgehalt durch 24stündiges Stehen abgesunken ist, noch durch Alkali-Säure, nicht aber durch Kinase die fermentative Wirkung verstärken kann. Bei der Aktivierung des Serums durch

Kinase spricht sich eine gewisse Spezifizität aus, die der Kinase, nicht aber dem Thrombogen zukommt. Die Aktivierung von Pferdeserum mit Kinase gelang weniger gut als die von Rinderserum, während die Aktivierung durch Alkali gerade im Pferdeserum besonders leicht gelingt.

3. Die Eigenschaften der Kinase.

Über die Eigenschaften der Thrombokinase kann ziemlich kurz hinweggegangen werden, da wir es hier mit dem gerinnungsbeschleunigenden Körper zu tun haben, den Conradi a. a. O. bereits genau beschrieben hat.

Mit den zymoplastischen Substanzen A. Schmidts ist die Kinase nicht identisch, da sie durch Alkohol gefällt wird und nicht hitzebeständig ist. Trotz vieler Bemühungen ist es mir nicht gelungen, diese Substanzen darzustellen. Die alkoholischen eingedampften Extrakte waren regelmäßig ohne Wirkung.

Kinase findet sich zwar in allen Geweben, wird jedoch besonders reichlich aus nukleinreichen Organen, z. B. Thymus usw. gewonnen. Ob sie selbst ein Nukleoproteid ist, oder nur den Nukleoproteiden (z. B. dem Kalzium-Salz des Nukleohistons) anhaftet, will ich nicht entscheiden. Vielleicht rücken durch diese Erfahrung die Beobachtungen von Lilienfeld*), Pekelharing und Huiskamp**) in ein anderes Licht.

Auch aus Erythrocyten läßt sich Kinase darstellen.

In der Thymus waren zuweilen geringe Fermentmengen nachzuweisen. Dieselben fanden sich jedoch nicht konstant. Da die Thymusextrakte meist etwas rötlich gefärbt waren, so durfte man berechtigt sein, diese Fermentmengen auf Blutbeimengungen zurückzuführen. Die gut ausspülbare Leber war stets ganz frei von Ferment, enthielt aber bedeutende Mengen Kinase. Durch Erhitzen kann man das Ferment in der Thymus unwirksam machen, während die Kinasewirkung noch deutlich nachweisbar bleibt.

Daß die Kinase ein einheitlicher Körper ist und daß nicht etwa die verschiedensten Eiweißkörper als Kinasen wirken können, geht daraus hervor, daß es auf unserer Klinik gelungen ist, eine Antikinase zu gewinnen.

4. Die Mitwirkung der Thrombokinase bei der normalen Blutgerinnung.

Da die Kinase bisher nur in Gewebssäften gefunden wurde, ist der Einwand zu machen, daß sie sich an der normalen Blutgerinnung nicht beteiligt. Zwar spricht schon die Kalkwirkung

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie 20, 89.
**) Ebenda 39, 22.

dagegen, jedoch soll darauf noch näher eingegangen werden. Daß die Kinase aus den Gewebssäften sich nicht im zirkulierenden Blute findet, ist allerdings ganz sicher. Sonst müßte das Plasma Kinase enthalten. Da sie aber in Erythrocyten und besonders in Lymphocyten, normalen Bestandteilen des Blutes, nachgewiesen ist, steht der Annahme von der Mitwirkung der Kinase nur der Umstand im Wege, daß wir dieselbe erst durch Zertrümmern der Zellen gewonnen haben, ein Plättchen- oder Leukocytenzerfall vor der Gerinnung uns aber keineswegs bewiesen erscheint. Um diesen Einwand zu entkräften, wurde frische Thymus, die nur einmal durch die Fleischhackmaschine geschickt worden war, und endlich noch ein Stückchen dieser Drüse ohne jede Vorbehandlung in Serum gebracht. Auch in diesen Fällen wurde schon in kurzer Zeit eine Aktivierung desselben beobachtet.

5. Theoretische Verwertung der Befunde.

Im Hinblick auf die oben erwähnten Tatsachen müssen wir annehmen, daß im extravaskulären Blut durch Austritt von Thrombogen und von Thrombokinase aus den geformten Elementen bei Anwesenheit von Kalksalzen Ferment entsteht. Wie man sich den Einfluß der Kinase und des Kalks auf das Thrombogen vorzustellen hat, ist vorerst noch unbekannt. Wahrscheinlich wirkt die Kinase nicht als Ambozeptor im Sinne Ehrlichs, da sonst alle Antithrombine auch Antikinasen sein müßten, was nicht der Fall ist. Auch die Spezifizität der Kinasen im Gegensatz zur unspezifischen (oder jedenfalls weniger spezifischen) Wirkung der Thrombine spricht dagegen.

Läßt man Kalziumionen auf jeden einzelnen der beteiligten Faktoren einwirken und bringt dann die entkalkten Lösungen zusammen, so beobachtet man keine aktivierende Wirkung.

Demnach würde folgendes Schema eine der möglichen Anschauungen ausdrücken:

$$\begin{array}{lcl} \text{Thrombogen} & \leftarrow & \text{Kinase} \\ | & & \\ \alpha\text{-Proferment} & \leftarrow & \text{Ca} \\ | & & \\ \text{Ferment.} & & \end{array}$$

Natürlich lassen sich auch andere Anschauungen entwickeln, die sämtlich jedoch vorläufig nur beschränkten Wert beanspruchen können.

Bei der normalen Blutgerinnung wird nur ein Teil des vorhandenen Thrombogens aktiviert, entweder, weil nicht genug Kinase vorhanden ist oder weil der Vorgang aus anderen Gründen

eine Unterbrechung erfährt. Daß nicht der Mangel an Ca-Ionen das hemmende Moment ist, ersieht man daraus, daß Serum durch Kalziumzusatz nicht aktiviert werden kann. Damit soll aber keineswegs geleugnet werden, daß reichlicher Überschuß an Kalksalzen den Ablauf des Prozesses beschleunigen kann, was in der Tat der Fall ist.

Daß die hier gegebene theoretische Deutung der gefundenen Resultate keine Theorie der Blutgerinnung ist, braucht kaum gesagt zu werden. Sicher spielen dabei neben den erwähnten Faktoren auch gerinnungshemmende Einflüsse eine große Rolle. Wir werden daher nicht in den Fehler verfallen, jede Beschleunigung oder Verlangsamung der Gerinnung auf die Kinase zurückzuführen.

Die Aufklärung über die Wirkung der Kinase, die im Grunde ja nur eine genaue experimentelle Begründung früherer Vermutungen und Beobachtungen ist, scheint uns geeignet zu sein, einen großen Teil der Widersprüche zu lösen, die das morphologische und chemische Studium der Gerinnung so sehr erschweren. Leider muß ich es mir versagen, hier auf die literarischen Einzelheiten einzugehen.

Betreffs des β-Profermentes, über dessen Herkunft und Bedeutung ich mich in einer früheren Mitteilung nach keiner Seite hin bindend ausgesprochen habe, kann ich auch jetzt noch keine sicheren Angaben machen. Am wahrscheinlichsten erscheint mir die Ansicht, daß es Thrombin ist, das in einen inaktiven Zustand übergegangen ist. [Fuld.*)]

Auch die morphologische Betrachtungsweise der Blutgerinnungsfrage, die bekanntlich zu den größten Kontroversen geführt hat, erfährt durch die oben entwickelte Anschauung insofern eine Vereinfachung, als die Ansichten sämtlicher Forscher insofern einen Kern von Berechtigung gewinnen, als sich (wenigstens theoretisch) sämtliche geformten Elemente als Träger von Kinase an der Gerinnung beteiligen können. Zweifellos fällt jedoch den weißen Blutkörperchen oder den Plättchen die größte Rolle dabei zu. Für die Herkunft des Thrombogens, des nur auf das Blut (und die Lymphe) beschränkten Bestandteiles, können wir mit Sicherheit entweder ausschließlich oder wenigstens vornehmlich die Blutplättchen verantwortlich machen. Daß die Lymphocyten in dieser Beziehung indifferent sind, haben wir gesehen, ebensowenig ließ sich ein Beweis für die Beteiligung der polynukleären

*) Biochem. Centralblatt 1, Nr. 4.

Leukocyten erbringen. Die vollständige Reindarstellung der Blutplättchen in größerer Menge aus Fluorid- oder Natriummetaphosphatplasma gelingt keineswegs so schwer, als man früher annahm.

Die hier kurz mitgeteilten Versuche gewinnen ein gewisses allgemeines Interesse, wenn man daran denkt, daß sich in neuester Zeit die Beobachtungen über Kinasen, die Fermente aktivieren, mehren. Es sei nur an das Protrypsin und die Enterokinase, sowie an die Beobachtungen von Cohnheim*) und Hirsch**) über das glykolytische Ferment erinnert. Vielleicht wird es gelingen, die Anzahl der vorliegenden Beobachtungen bald zu vermehren und dann weitergehende Schlüsse auf die Natur und Wirkungsweise der Fermente und der ihnen nahe stehenden Körper zu ziehen.

Tübingen, im November 1903.

*) Zeitschrift f. physiol. Chemie **39**, 336.

) Diese Beiträge **4, Heft 11.

X.

Über Antitoxinbildung bei Autolyse.

Von Dr. L. **Blum**, Assistenten am pathologischen Institut.

Aus den Instituten für physiologische Chemie und für Hygiene und Bakteriologie in Straßburg.

I.

Die wunderbare Fähigkeit des tierischen Organismus auf die Einfuhr körperfremder Substanzen sehr verschiedener Art, durch die Bildung von spezifischen Schutzstoffen zu reagieren, hat uns einen Einblick in ein ungeahntes Gebiet physiologischer und pathologischer Vorgänge eröffnet. Unsere Kenntnisse freilich über die Entstehung und Bildungsstätte dieser Substanzen, sowie über ihre Natur und Wirkungsweise sind trotz der vielen einschlägigen Untersuchungen infolge von Schwierigkeiten der mannigfachsten Art noch ganz unzureichend.

In zahlreichen Arbeiten hat man sich bemüht, etwas über die chemische Natur der Antikörper zu erfahren, sie vor allem von den anhaftenden Bestandteilen des Blutserums, namentlich den Eiweißkörpern, zu trennen. War dies für die Antitoxine schon aus rein praktischen Gründen wünschenswert, so konnte überdies erhofft werden, durch eine chemische Charakterisierung der Substanzen auch etwas über ihre Abstammung und ihre Bildungsstätte zu erfahren. Bei ihrer großen Labilität gegenüber chemischen Agentien waren hierbei von vorneherein alle intensiver wirkenden chemischen Hilfsmittel ausgeschlossen; aber auch von weniger eingreifenden Untersuchungsarten erwies sich nur die Fällung mit Neutralsalzen als unschädlich und brauchbar. Wenn sich auch eine Konzentration*) und Befreiung von vielen

*) Brieger und Cohn, Zur Konzentration der gegen Wundstarrkrampf schützenden Substanz aus der Milch. Zeitschr. f. Hygiene **15**, 439. — Wassermann, Über Konzentrierung des Diphtherieantitoxins aus der Milch immunisierter Tiere. Das. **18**, 235.

anhaftenden Serumbestandteilen auf diesem Wege als möglich erwies*), so war eine befriedigende Reinigung doch nicht zu erreichen, und ebensowenig führten Versuche zum Ziele, in welchen nach dem Vorgang Jakobys bei der Isolierung des Ricins**) Salzfällung mit Einwirkung verdauender Fermente kombiniert wurde***).

Einen direkteren Weg zur Erforschung der Bildungsstätte der Antikörper stellen die Versuche dar, in denen die verschiedenen Organe von normalen oder immunisierten Tieren, besonders solchen, die im Beginne der Immunisation standen, auf ihren Gehalt an Antikörpern untersucht wurden. So konnte Kondratjeff†) aus Milz und Nebennieren normaler Tiere Substanzen isolieren, die gegen Tetanusgift sowohl immunisierend als auch entgiftend wirkten, soweit, daß 50 Proz. der Tiere vor dem Tode, nicht aber vor dem Ausbruch der Krankheitssymptome geschützt werden konnten. Beachtenswerter sind in dieser Richtung die Untersuchungen von N. Sieber††) über die Wirkung von Oxydasen auf die Toxine. Sieber konnte mittels 8proz. Salpeterlösung nach dem Verfahren von Abelous aus den verschiedensten frischen Organen Oxydasen erhalten, die im Reagenzglase sowohl Diphtherie- als Tetanustoxin neutralisierten, dann auch bei gleichzeitiger Injektion an verschiedenen Körperstellen gegen die 20fache letale Dosis schützten. Das Blutserum von gegen Diphtherie immunisierten Pferden zeigte einen erheblichen Gehalt an solchen Oxydasen, während normales Pferdeserum keine oder nur sehr geringe Mengen enthielt.

---

*) Brieger und Ehrlich, Beiträge zur Kenntnis der Milch immunisierter Kühe. Zeitschr. f. Hygiene 13, 336. — Brieger und Boer, Über Antitoxine und Toxine. Das. 21, 259. — Buchner, Über den Einfluß der Neutralsalze auf Serum, Alexine, Enzyme. Archiv f. Hygiene 17, 138. — E. Freund und Sternberg, Über Darstellung des Heilkörpers aus Diphtherieheilserum. Zeitschr. f. Hygiene 31, 429. — Ide und Lemaire, Archives internation. de Pharmakotherapie 6, 1899. — Seng, Über die qualitativen und quantitativen Verhältnisse der Eiweißkörper im Diphtherieheilserum. Zeitschr. f. Hygiene 30, 513. — Tizzoni, Über experimentelle Immunität gegen Tetanus. Festschrift für Virchow 3, 31.

**) Jakoby, Über die chemische Natur des Ricins. Archiv f. experim. Pathologie 46, 28.

***) E. P. Pick, Zur Kenntnis der Immunkörper. Diese Beiträge 1, 351. — Jakoby, Über Ricinimmunität. Das. 1, 50.

†) Kondratjeff, Wratsch 1895, Nr. 15, referiert im Centralblatt für Bakteriologie, Abt. I, 18, 77 und das. 21, 407.

††) Sieber, Über die Wirkung der Oxydasen auf die Toxine. Zeitschr. für physiol. Chemie 32, 572 und Archives des sciences biologiques de St. Petersbourg 9, Nr. 2.

Hierher gehört auch der bekannte Versuch von Wassermann und Takaki*), wonach Gehirnbrei verschiedener Tiere Tetanusgift zu neutralisieren vermag, während allerdings die entgiftende Wirkung des Gehirnbreis im Organismus nach den Angaben von Wassermann selbst weit unsicherer zu sein scheint [Metschnikoff, Marie, Danysz, Besredka, Dmitriewsky**)]. Eine ähnliche entgiftende Wirkung des Zentralnervensystems konnten Kempner und Schepilewsky***) für das Botulismusgift feststellen, während gegenüber Kobragift eine solche Wirkung nicht zu verzeichnen ist [Myers†)]; die Nebennieren allein von allen untersuchten Organen äußerten einen Einfluß auf dasselbe. Während die Untersuchung der Organe immunisierter Tiere auf ihren Antitoxingehalt [Vaillard††), Metschnikoff, Dzierzgowsky†††)] keine wesentliche Förderung in dieser Richtung brachte, waren die Ergebnisse von Versuchen mit Organen von Tieren, die im Beginne der Immunisierung standen, ausschlaggebender. So konnten Pfeiffer und Marx*†) Milz und Knochenmark als Bildungsstätte für die Choleraimmunstoffe, Wassermann**†) und Deutsch***†) die lymphoiden Organe als Entstehungsort für die Typhusschutzstoffe und

*) Wassermann und Takaki, Über tetanusantitoxische Eigenschaft des normalen zentralen Nervensystems. Berlin. klin. Wochenschr. 1898, S. 1. Siehe auch Marx, Über die tetanusgiftneutralisierende Eigenschaft des Gehirns. Zeitschr. f. Hygiene **40**, 230.

) Metschnikoff, De l'influence de l'organisme sur les toxines. Annales de l'Institut Pasteur **12, 83 u. 263. — Marie, Recherches sur les propriétés antitétaniques des centres nerveux de l'animal sain. Das. **12**, 91. — Danysz, Action de la toxine tétanique sur la substance nerveuse. Das. **12**, 156. — Besredka, Fixation de la toxine tétanique dans le cerveau. Das. **17**, 130. — Dmitriewsky, Propriétés antitétaniques des centres nerveux. Das. **17**, 148.

***) Kempner und Schepilewsky, Über antitoxisch wirkende Substanzen gegenüber dem Botulismusgift. Zeitschr. f. Hygiene **27**, 213.

†) Myers, Cobrapoison in relation to Wassermanns new theory of immunity, referiert im Centralblatt f. Bakteriologie, Abt. I, **25**, 40.

††) Vaillard, Contribution à l'étude du tétanos. Annales de l'Institut Pasteur **7**, 81.

†††) Dzierzgowsky, Über den Gehalt an Antitoxinen in den Flüssigkeiten und Organen eines gegen Diphtherie immunisierten Pferdes. Archiv f. exper. Pathologie u. Pharmakologie **38**, 186.

*†) Pfeiffer und Marx, Über die Bildungsstätte der Choleraschutzstoffe. Zeitschr. f. Hygiene **27**, 292.

**†) Wassermann, Über eine neue Art von Immunität. Berl. klin. Wochenschr. 1898, S. 209.

***†) Deutsch, Origine des anticorps typhiques. Annales de l'Institut Pasteur **13**, 689.

Römer*) die Bildung des Antiabrins in der Konjunktiva und in Milz und Knochenmark nachweisen.

Wenn wir an der Hand dieser positiven Befunde nach der Art der Bildung der Antikörper fragen, so sind es hauptsächlich zwei Anschauungen, die uns zur Zeit hierüber Aufschluß zu geben versuchen; die eine, von der auffallenden Tatsache ausgehend, daß die Antikörper mit geringer Ausnahme [Tetanusantitoxin schützt gegen Kobragift, Serum von Schlangengift gegen Skorpionengift**) usw.] spezifisch sind und daß ihre Bildung nur durch die eingeführten Substanzen ausgelöst wird, sieht in ihnen Umwandlungsprodukte der eingeführten Gifte, also Stoffe, die normalerweise im Organismus nicht vorhanden sind. [Buchner***), Metschnikoff†), Gruber††).] Dem entgegen verficht die Seitenkettentheorie Ehrlichs†††), daß die Antikörper schon normale Zellbestandteile sind, „Rezeptoren", die nach der Einwirkung des Toxins auf die giftempfindlichen Zellen von denselben im Übermaße gebildet und ins Blut abgestoßen werden.

So verschieden die beiden Ansichten auch sein mögen, so setzen beide eine Reaktion des Organismus voraus, die Antikörper stellen „Sekretionsprodukte" der Zellen dar. Nach beiden Theorien ist ihre Bildung ein aktiver Vorgang; die durch das Gift gereizte Zelle erzeugt im antitoxischen Sinne wirksame, reaktionsfähige Stoffe oder Gruppen (Rezeptoren) in übernormaler Zahl auf Kosten der eigenen Zellsubstanz oder auf Kosten zugeführter Bestandteile des Organismus oder aus dem Toxin selbst.

Während hiernach die Antikörperbildung der Ausdruck einer Funktionssteigerung der Zelle darstellt, ist andererseits auch die Frage zu erwägen, ob bei den zur aktiven Immunität führenden Prozessen (die ja allein hier in Betracht kommen) nicht auch Bedingungen gegeben sind, die zu einem vermehrten Zellzerfall in den Organen führen, und ob bei der daran sich anschließenden

*) Römer, Experimentelle Untersuchungen über Abrinimmunität. Archiv f. Ophthalmologie 52, 72.

**) Calmette, Contribution à l'étude des venins, toxines et des sérums antitoxiques. Annales de l'Institut Pasteur 9, 225.

***) Buchner, Über Bakteriengifte und Gegengifte. Münchener med. Wochenschr. 1893, S. 380.

†) Metschnikoff, L'Immunité dans les maladies infectieuses S. 396.

††) Gruber, Über Toxin und Antitoxin. Münchener med. Wochenschr. 1903, S. 1193.

†††) Ehrlich, Die Wertbemessung des Diphtherieheilserums und deren theoretische Grundlagen. Klin. Jahrbuch 6, 13 (1899). — Schlußbetrachtungen in Nothnagels Spezieller Pathologie u. Therapie 8, 163. — Siehe auch Toxin und Antitoxin. Münchener med. Wochenschr. 1903, S. 1428 u. 1465.

Autolyse der untergegangenen Zellen nicht Produkte gebildet werden, die dem Organismus als Schutzmittel dienen. Verfolgt man in dieser Richtung die Beobachtungen, wie sie bei den verschiedensten aktiven Immunisierungsversuchen gemacht worden sind, so zeigt sich, daß diese Prozesse bei Warmblütern in der weitaus größten Anzahl der Fälle mit Fieber, Leukocytose und Gewichtsverlust einhergeben.*) Es gelang Conradi**) in der Tat, bei der Autolyse der verschiedensten Organe das Auftreten von bakteriziden Stoffen nachzuweisen und in einzelnen Versuchen auch eine immunisierende Wirkung dieser Produkte wahrscheinlich zu machen. Levaditi***) konnte bei der Autolyse von Mesenteriallymphdrüsen auch alkohollösliche, thermostabile Hämolysine nachweisen. Haben auch die Untersuchungen über bakterizide und antitoxische Immunität ergeben, daß beide streng zu scheiden sind, und daß das Auftreten der einen keineswegs mit der Entstehung der anderen verbunden zu sein braucht, so besteht doch in ihrer Entstehungsart, ihrer Spezifizität und Wirkungsweise eine große Ähnlichkeit, die zur Untersuchung der autolytischen Produkte in bezug auf ihre antitoxische Wirkung aufforderte.

II. Eigene Versuche.

Die Frage, die mich zunächst beschäftigte, war, ob sich unter den Produkten der Autolyse etwa antitoxische Stoffe befinden. Im Anschluß an die oben erwähnten Untersuchungen von Pfeiffer und Marx, Deutsch, Wassermann und Römer über die Bildungsstätte der Cholera- und Typhusschutzstoffe und des Antiabrins wurden hauptsächlich lymphatische Organe zur Autolyse benutzt. Als solche standen Lymphdrüsen und Thymus vom Rinde, Milz vom Pferd, Hund und Rind zur Verfügung. Außerdem wurden noch die Produkte der Autolyse von Lebern dieser drei Tierarten, sowie gelegentlich von anderen Organen einer Prüfung unterzogen. Ich verzichtete dabei auf die aseptische Autolyse wegen der Schwierigkeit, die sich der aseptischen Entnahme von Organen entgegenstellen; es kam ausschließlich die antiseptische Autolyse

*) Knorr bei Behring, Geschichte der Diphtherie S. 166. — Behring, Allgemeine Therapie der Infektionskrankheiten in Eulenburgs Realenzyklopädie S. 1051. — Metschnikoff, L'Immunité etc. S. 386 u. ff. Bei Kaltblütern konnte allerdings keine Temperatursteigerung gefunden werden. Metschnikoff, Das. S. 349 u. Annales de l'Institut Pasteur 11, 805.

**) Conradi, Über die Bildung bakterizider Stoffe bei der Autolyse. Diese Beiträge 1, 191.

***) Levaditi, Sur les hémolysines cellulaires. Annales de l'Institut Pasteur 17, 186.

zur Anwendung, wie sie von Conradi*) eingehend beschrieben worden ist.

Die Organe wurden fein gehackt mit Toluol verrührt, dann mit dem doppelten Gewicht physiologischer Kochsalzlösung versetzt und im Brutschrank bei annähernd 37° belassen. Ein Zusatz von Alkali erfolgte nicht.

Zur Prüfung der antitoxischen Wirkung der autolytischen Produkte wurde vom Organbrei abfiltriert, im Scheidetrichter vom Toluol, das durch Fett und andere Stoffe gelb gefärbt war, getrennt und die klare Flüssigkeit nach der Ehrlichschen Methode**) durch Vermischen mit dem Toxin im Reagenzglase auf ihre Entgiftungsfähigkeit geprüft. Die Injektion der Flüssigkeit geschah sofort nach der Mischung***). Meist wurde jedoch zwecks Konzentrierung des Filtrats dasselbe im Vakuum bei einer Temperatur des Wasserbades unter 40° auf ein kleineres Volum, etwa $^1/_4$ bis $^1/_3$ des ursprünglichen, eingeengt und dann die Neutralisationskraft geprüft. Es konnten so einmal kleinere Mengen von Schutzstoffen erkannt, andererseits konnte bei den Tierversuchen auch mit geringeren Mengen Flüssigkeit gearbeitet werden.

Von Toxinen kamen zur Verwendung Tetanustoxin, Diphtherietoxin und Kobragift.

Das Tetanustoxin war durch Aussalzung mit Ammonsulfat nach der Methode von Brieger-Ehrlich gewonnen und änderte seine Giftigkeit beim Aufbewahren im trockenen Zustande nicht; die Herstellung der Giftlösung geschah durch Lösung einer abgewogenen Menge in destilliertem Wasser, Zentrifugieren und Trennung von dem geringen Bodensatz; die klare Lösung wurde im Eisschrank unter Toluol aufbewahrt.

Als Diphtherietoxin stand mir virulentes Chamberlandfiltrat von Kulturen zur Verfügung†).

*) Conradi, a. a. O.

**) Ehrlich, a. a. O. Klinisches Jahrbuch 6.

***) Es erfolgt allerdings die Reaktion zwischen den verschiedenen Toxinen und Antitoxinen mit variabler Geschwindigkeit, indem Tetanustoxin und -antitoxin zur Neutralisation eine erheblich längere Zeit beanspruchen als Diphtherietoxin und -antitoxin. (Ehrlich.) Anderseits ist in verdünnten Lösungen auch die Bindung von Toxin und Antitoxin viel unvollkommener als in konzentrierteren (Knorr, Experimentelle Studien über die Grenzen der Heilungsmöglichkeit des Tetanus. Marburg 1895).

†) Ich verdanke dasselbe der Güte des Herrn Dr. Martin vom Institut Pasteur in Paris. Für Überlassung des Cobragiftes bin ich Herrn Privatdozent Dr. Faust vom hiesigen pharmakologischen Institut zu Dank verpflichtet.

Der Kürze wegen ist in den folgenden Versuchen von den Zeichen Gebrauch gemacht, wie sie Behring*) bei seinen Untersuchungen einführte: 0 bedeutet keine Krankheitssymptome, die Grade der Erkrankung sind durch Striche ausgedrückt, so daß -- - ganz leichte, = = etwas schwerere usw. Erkrankung ausdrückt, † den Tod anzeigt.

A. Versuche mit Tetanustoxin.

Versuch I.

Rindermilz, 8 Mon. autolysiert. 250 ccm der autolytischen Flüssigkeit werden auf 60 ccm eingeengt. Reaktion schwach sauer.

Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf		
Toxin	autolyt. Flüss.		1. Tag	2. Tag	3. Tag
5f. let. Dos.	0,2 ccm	20 g	—	— — —	†
„	0,4 „	18 „	–	[illegible]	†
„	0,4 „	17 „	—	—	†
„	0	21 „	- -	†	
0	0,4 „	18 „	0	[illegible]	

Da die Injektion größerer Mengen (0,6 ccm) der autolytischen Flüssigkeit schon allein tödlich war, wurde eine Nachprüfung an Meerschweinchen vollzogen.

Toxinmenge: 30fache letale Dosis.

Injiziert		Gewicht	Verlauf
Toxin	autolyt. Flüss.		
30f. let. Dos.	10 ccm	360 g	† nach 5 Tagen an Tetanus
„	20 „	350 „	† nach 5 Tagen an Tetanus
„	0	340 „	† nach 2 Tagen an Tetanus

Auch die präventive Injektion von 10 ccm vermochte nicht die Tiere vor einer Vergiftung zu retten; allerdings zeigten auch Meerschweinchen oft Vergiftungserscheinungen nach Injektion der autolytischen Flüssigkeit allein.

Versuch II.

Pferdemilz, 4 Mon. und 14 Tage autolysiert. 300 ccm auf 60 ccm eingeengt. Reaktion schwach alkalisch.

Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf
Toxin	autolyt. Flüss.		
10—15f. let. Dos.	0,5 ccm	18 g	† nach 2 Tagen an Tetanus
„	0,8 „	16 „	† nach 2 Tagen an Tetanus
„	0	16 „	† nach $2^1/_2$ Tagen an Tetanus
0	0,8 „	19 „	0

*) Behring, Allgemeine Therapie der Infektionskrankheiten.

Versuch III.

Hundemilz, 3 Mon. autolysiert. Autolytische Flüssigkeit nicht eingeengt, amphoter.

Injiziert		Gewicht der	Verlauf			
Toxin	autolyt. Flüss.	Mäuse	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag
1–2f. let. Dos.	0,5 ccm	19 g	0	—	—	— nachm. †
"	0,8 "	21 "	0	—		— "
"	0	20 "	0	—		† morgens
0	0,8 "	17 "	0			

Versuch IV.

Hundemilz, 8 Mon. 14 Tage autolysiert. Flüssigkeit nicht eingeengt, schwach alkalisch.

Injiziert		Gewicht der	Verlauf			
Toxin	autolyt. Flüss.	Mäuse	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag
100f. let. Dos	0,01 ccm	17 g	nach 12 Stunden Tetanus, † nach 20 Stunden			
"	0,1 "	18 "				
"	0,5 "	16 "				
"	0,8 "	17 "				
"	0	18 "				
10–15f. let. Dos.	0,5 ccm	18 g	0	—	— in der Nacht †	
"	1,0 "	20 "	0		—	
"	0	19 "	0	—	—	
0	1,0 "	16 "	0		0	

Die Milz stammte von einem Hunde, der mit Tetanusgift vergiftet war: ein 40 kg schwerer Hund erhält subkutan 1½ ccm vom Chamberlandfiltrat einer Tetanuskultur, wovon 0,00002 ccm die tödliche Dosis für eine Maus darstellen; nach 6 Tagen, als noch keine Erscheinungen aufgetreten waren, neue subkutane Injektion von 1 ccm desselben Filtrats. Nach 48 Stunden Trismus, etwas Steifigkeit, Tod. Die Untersuchung der frischen Organe zeigte, daß dieselben deutlich tetanuserregend wirkten.

Versuch V.

Kalbsthymus, 6 Wochen autolysiert. Flüssigkeit nicht eingeengt. Neutrale Reaktion.

Injiziert		Gewicht der	Verlauf			
Toxin	autolyt. Flüss.	Mäuse	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag
1–2f. let. Dos.	0,5 ccm	19 g	0	—	— †	
"	0,8 "	20 "	—	—	—	morgens †
"	0	22 "	0	—	—	— abends †
0	0,8 "	16 "	0			

Versuch VI.

Rindsleber, 8 Mon. 14 Tage autolysiert. 100 ccm eingeengt auf 42 ccm. Reaktion schwach alkalisch.

Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf			
Toxin	autolyt. Flüss.		1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag
10—15f. let. Dos.	0,1 ccm	18 g	—	=	†	
"	0,2 "	17 "	—	=	†	
"	0,5 "	18 "	—	=	≡†	
"	0	17 "	0	=	≡†	
"	0,5 "	15 "	0			

Versuch VII.

Hundeleber, 5 Mon. 6 Tage autolysiert. 150 ccm der autolyt. Flüssigkeit auf 50 ccm gebracht. Reaktion alkalisch.

Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf
Toxin	autolyt. Flüss.		
5f. let. Dos.	0,5 ccm	17 g	† an Tetanus nach $2^1/_2$ Tagen
"	0,7 "	19 "	† an Tetanus nach $2^1/_2$ Tagen
"	0	18 "	† an Tetanus nach $2^1/_2$ Tagen
0	0,7 "	19 "	0

Versuch VIII.

Leber eines mit Tetanustoxin vergifteten Hundes (s. Versuch IV), 12 Mon. autolysiert. Flüssigkeit nicht eingeengt. Schwach alkalische Reaktion.

Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf				
Toxin	autolyt. Flüss.		1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
1—2f. let. Dos.	0,5 ccm	20 g	0	—	=		†
"	0,8 "	22 "	0	—	≡	≡	†
"	0	22 "	0	-	≡	†	
"	0,8 "	24 "	0				

Versuch IX.

Hoden desselben Tieres, 11 Mon. 20 Tage autolysiert. Flüssigkeit nicht eingeengt. Reaktion amphoter.

Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf			
Toxin	autolyt. Flüss.		1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag
1—2f. let. Dos.	0,5 ccm	22 g	0	≡	†	
"	0,8 "	24 "	0	=	†	
"	0	22 "	0	—	=	†
0	0,8 "	26 "	0			

Versuch X.

Lymphdrüsen vom Rinde, 7 Mon. 10 Tage autolysiert. Filtrat nicht eingeengt.

Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf					
Toxin	autolyt Flüss.		1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
10—15f. let. Dos.	0,2 ccm	17 g	0	0	—	—	0	0
"	0,5 "	18 "	0	bleiben gesund				
"	1,0 "	17 "	0					
"	0	18 "	—	— nachm. †				
0	1,0 "	19 "	0					

Versuch XI.

Chamberlandfiltrat der in Versuch X verwandten Flüssigkeit.

Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf					
Toxin	autolyt. Flüss.		1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
10—15f. let. Dos.	0,2 ccm	18 g	0	—	—	†		
"	0,5 "	19 "	0	0	—	—	— erholt sich	
"	1,0 "	18 "	0	0	—	—	—	0
"	"	19 "	—	— †				

Versuch XII.

Lymphdrüsen vom Rinde wie in Versuch X.

Injiziert		*Gewicht der Meerschweinchen	Verlauf					
Toxin	autolyt. Flüss.		1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
100f. let. Dos.	2,0 ccm	285 g	0	—	—	—	†	
"	4,0 "	320 "	0		—	—	— †	
"	0	350 "	— †					
10f. let. Dos.	2,0 ccm	350 g	0	0	0	0	—	erholt sich
"	4,0 "	385 "	0	bleibt ges.				
"	0	295 "	—	—	†			

Versuch XIII.

Rinderlymphdrüsen, 36 Tage autolysiert. 400 ccm der autolytischen Flüssigkeit werden auf 180 ccm eingeengt*).

Injiziert		Gewicht der Meerschweinchen	Verlauf						
Toxin	autolyt. Flüss.		1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag
10f. let. Dos.	0,2 ccm	17 g	0	0		—	—	—	0
"	0,5 "	19 "	0	0	0	0 bleiben gesund			
"	1,0 "	17,5 "	0	0	0	0			
"	0	18 "	0	—	†				
0	1,0 "	20 "	0	gesund					

*) Beim Einengen auf ein kleineres Volum ließ die Flüssigkeit besonders bei längerem Stehen einen flockigen weißen Niederschlag ausfallen; derselbe

Es geht aus den vorstehenden Versuchen hervor, daß von den untersuchten autolytischen Produkten nur die von Rinderlymphdrüsen eine entgiftende Wirkung gegen Tetanustoxin zeigen. Aus Versuch XIII ergibt sich, daß bei 36tägiger Autolyse dieselbe schon vorhanden ist, schwächer allerdings als bei länger dauernder Autolyse wie im Versuche XII, besonders wenn man die stattgefundene Einengung in Versuch XII in Rechnung bringt.

Eine ganze Reihe anderer Versuche mit den autolytischen Produkten von Lymphdrüsen bei verschiedener Dauer der Autolyse und von verschiedenen Tieren bestätigten diese neutralisierende Wirkung immer, doch zeigte es sich, daß die Intensität der Wirkung bei den verschiedenen zur Autolyse angesetzten Lymphdrüsen wechselte, so daß zuweilen auch bei Konzentration auf das 4fache erst 0,7 ccm die 10fache letale Dosis neutralisierten, während andererseits 1 ccm eines nicht eingeengten Filtrats die 40 bis 50fache letale Dosis (für Mäuse) zu entgiften vermochte (Versuch XI). Ein solcher Unterschied ist bei den starken individuellen Variationen, wie sie uns gerade die Immunitätsforschung gezeigt hat, schon verständlich, andererseits scheinen aber auch äußere Momente, wie Reaktion, Dauer der Autolyse einen Einfluß auf die Bildung der giftbildenden Substanz auszuüben. So zeigte eine 5monatliche Autolyse von Lymphdrüsen bei saurer Reaktion viel geringere neutralisierende Wirkung, so daß 1 ccm nur gegen die 3 bis 5fache letale Dosis beim Vermischen im Reagenzglas wirksam war. Aus dem Versuch XI ergibt sich, daß bei $7^1/_2$ monatlicher Autolyse die Schutzkraft deutlich hervortritt. Die hier erhaltene Flüssigkeit zeigte sich am wirksamsten von den verschiedenen autolytischen Produkten, die zur Untersuchung kamen. Da in den übrigen Versuchen die Dauer der Autolyse auch in den besten Fällen um 2 bis 3 Monate kürzer war, so ist die Möglichkeit gegeben, daß hier die Dauer der Autolyse von Einfluß war; möglicherweise handelt es sich aber auch im vorliegenden Falle um individuelle Verschiedenheit.

Vor weiteren Untersuchungen über die Ursache dieser entgiftenden Eigenschaft war die Frage zu entscheiden, ob die Lymphdrüsen nicht schon im frischen Zustande solche Schutz-

---

konnte in Wasser nicht zur Lösung gebracht werden; er bestand etwa zur Hälfte aus organischer, mit deutlichem Horngeruch verbrennender Substanz. Die Prüfung des Niederschlags auf sein Giftbindungsvermögen ergab, daß eine solche nicht vorhanden war.

stoffe enthalten. Kondratjeff*) konnte, wie erwähnt, aus Milz und Nebennieren Lösungen herstellen, die geringe entgiftende Wirkung gegenüber Tetanustoxin aufwiesen und auch etwas immunisierend wirkten. Sieber**) hatte ebenfalls aus frischen Organen Oxydasen mit deutlich antitoxischer Wirkung gegenüber Tetanus- und Diphtherietoxin isolieren können, dabei aber Lymphdrüsen nicht angewendet. Demgegenüber haben Versuche der Anhänger der Phagocytentheorie***) mit den Leukocyten von Exsudaten oder den Leukocyten der lymphoiden Organe weder bei normalen Tieren Schutztoffe noch, wie schon angeführt, bei immunisierten Tieren einen besonders hohen Gehalt an solchen, der auf eine Bildungsstätte hingewiesen hätte, nachweisen können. So kamen in den Versuchen Dzierzgowskys†) über die Verteilung des Diphtherieantitoxins in den Flüssigkeiten und Organen eines gegen Diphtherie immunisierten Pferdes die Lymphdrüsen an fünfter Stelle hinter Nieren, Ovarien, Nebennieren und Speicheldrüsen, und auch in den Versuchen von Metschnikoff††) zeigte sich der Gehalt der Lymphdrüsen an Tetanusantitoxin viel geringer als derjenige anderer Organe, z. B. der Nieren und Ovarien. Geben somit diese Befunde keinen Anhaltspunkt für den Ort der Antikörperbildung, so kann doch aus ihnen geschlossen werden, daß diese Organe keine Anhäufungsstätte für die Schutzstoffe darstellen wie das Blutserum, in das wohl niemand die Bildung dieser Körper verlegt.

Im Anschluß an ihre Befunde von dem Auftreten von Schutzstoffen in den lymphoiden Organen bei Tieren, die im Beginne der Immunisation standen, bevor solche im Blute nachzuweisen waren, untersuchten Pfeiffer und Marx, Deutsch, Wassermann und Römer†††) auch die Organe normaler Tiere auf Antikörper; es gelang ihnen jedoch nicht, solche zu finden.

Zur Sicherstellung wurde der Preßsaft frischer Lymphdrüsen auf seine neutralisierende Wirkung gegenüber Tetanustoxin geprüft und von denselben Lymphdrüsen die autolytischen Produkte derselben Prüfung unterzogen.

Versuch XIV.

200 g frische Lymphdrüsen werden mit Quarzsand verrieben und in der Buchnerschen Presse ausgepreßt; das so erhaltene Filtrat zur Prüfung verwendet. Amphotere Reaktion mit etwas stärkerer saurer Komponente.

*) Kondratjeff, a. a. O.
**) Sieber, a. a. O.
***) Siehe Metschnikoff, L'Immunité dans les maladies infectieuses.
†) Dzierzgowsky, a. a. O.
††) Metschnikoff, a. a. O. Annales de l'Institut Pasteur 12, 83.
†††) A. a. O.

Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf				
Toxin	autolyt. Flüss.		1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
1—2f. let. Dos.	0,5 ccm	20 g	0	- -	–	†	
„	0,8 „	22 „	0		-	- =	†
„	0	23 „	0	- =	- -	†	
0	0,8 „	22 „	0	gesund			

Dem gegenüber zeigten die autolytischen Produkte nach 96tägiger Autolyse deutliche entgiftende Wirkung.

Versuch XV.

400 ccm der autolytischen Flüssigkeit auf 100 ccm eingeengt. Reaktion schwach alkalisch.

Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf				
Toxin	autolyt. Flüss.		1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
10f. let. Dos.	0,2 ccm	20 g	0	0	–	==	— erholt sich
„	0,5 „	19 „	bleiben gesund				
„	0,8 „	15 „					
„	0	20 „	0	=—	≡†		

Auch die präventive Injektion von frischem Preßsaft von Lymphdrüsen zeigte, wie zu erwarten war, keine entgiftende Wirkung.

Versuch XVI.

2 Mäuse von je 19 g und 20 g erhalten 0,4 g frischen Preßsaftes unter den Rücken, 7 Stunden darauf 1 bis 2fache letale Toxindosis unter die Bauchhaut injiziert; beide Tiere gehen an Tetanus zugrunde, die Kontrollmaus am 4. Tage an Tetanus ein.

Es führt also die Autolyse zur Bildung von Substanzen, die das Tetanustoxin im Reagenzglase zu neutralisieren vermögen. Da der frische Preßsaft von Lymphdrüsen keine Wirkung in diesem Sinne äußert, so können diese Schutzstoffe einmal durch Autolyse aus einer noch gänzlich unbekannten Vorstufe gebildet sein, ob durch hydrolytische Spaltung, Oxydation, bleibt vorläufig dahingestellt — es ist aber auch an die Möglichkeit zu denken, daß Substanzen, die diesen Schutzstoffen antagonistisch entgegen wirken, durch die autolytischen Fermente abgebaut werden, so daß dann erst die schützende Wirkung zur Geltung gelangen kann. Beruht nun diese Fähigkeit der autolytischen Produkte von Lymphdrüsen, im Reagenzglase Tetanustoxin zu binden, auf einer echten antitoxischen Wirkung, die sich auch bei getrennter Injektion von Toxin und autolytischer Flüssigkeit im Tierkörper äußert und auch bei präventiver Injektion sich als immunisierend erweist, oder haben wir es hierbei nur mit einer sogenannten

pseudoantitoxischen Wirkung*), die sich nur im Reagenzglase entfaltet, zu tun? Bekanntlich vermag auch Karmin die 100fache letale Dosis Tetanustoxin bei Mischung im Reagenzglase zu binden [Stoudensky**)] und auch von anderen, zum Teil kristallinischen Substanzen kennen wir diese Wirkung; so konnten ja Phisalix und Bertrand***) für das Lecithin, Cholesterin, Tyrosin und die Gallensäuren entgiftende Wirkung gegenüber Kobragift, Kempner und Schepilewsky†) dasselbe Verhalten für das Gift des Bacillus botulinus dartun; auch für Tetanolysin ist dasselbe festgestellt worden [Noguchi††), Kyes und Sachs†††)]. Desgleichen zeigten auch Öle und Fette, Nukleohistone*†) und Albumosen**†) (allerdings nur geringe und nicht konstante) entgiftende Eigenschaften gegenüber verschiedenen Toxinen. Bei der Autolyse der Organe treten auch die verschiedensten Abbauprodukte der Eiweißkörper auf, Albumosen, Peptone —, wenn auch nur in äußerst geringer Menge —, und Aminosäuren; andererseits enthält eine solche autolytische Flüssigkeit immer Fett, das allerdings in das Toluol übergeht und bei der oben geschilderten Trennungsart nur in sehr geringer Menge zurückbleibt. Die folgenden Versuche über den Einfluß der Temperatur zeigen, daß auch, abgesehen von dem Unterschied in quantitativer Beziehung, die Wirkung der neutralisierenden Substanz weder der von Albumosen noch der von Aminosäuren gleichzusetzen ist, da sie durch Erhitzen auf 80° zerstört wird, während diese Substanzen ihre Wirkung hierbei nicht einbüßen; es wäre auch auffallend, daß allein die von der Lymphdrüsenautolyse herstammenden Albumosen und Aminosäuren eine solche Bindung entfalteten, während die bei der Autolyse anderer Organe entstehenden gleichen Produkte dieses nicht vermöchten.

*) Bashford, Journal of pathology and bacteriology 8, 52, 1902.

**) Stoudensky, Action antitoxique du Carmin. Annales de l'Institut Pasteur 13, 126.

***) Phisalix, Comptes rendus de l'Académie des Sciences 1897, p. 1053. Comptes rendus de la Société de Biologie 1897, p. 1057; 1898, p. 153.

†) Kempner und Schepilewsky, a. a. O.

††) Noguchi, The antihämolytic Action of Bloodsera, Milk and Cholestearin upon Agaricin, Saponin and Tetanolysin. Univ. of Penna. Medic. Bulletin 15, Nr. 9.

†††) Kyes und Sachs, Zur Kenntnis der Kobragift aktivierenden Substanzen. Berliner klin. Wochenschr. 1903, Nr. 2 bis 4.

*†) Freund, Grosz und Jellinek, Über die Beziehung zwischen Gerinnung und der Wirkung der Antitoxine. Centralbl. f. innere Medizin 16, 913 u. 937.

**†) Freund und Grosz, Über Beziehung von Albumosen zur passiven Immunisierung. Das. 17, 497.

Auch im Tierkörper sind die autolytischen Produkte von Lymphdrüsen fähig Tetanusgift zu neutralisieren, man ist imstande sowohl durch vorhergehende Injektion der Flüssigkeit gegen das Gift zu immunisieren, als auch durch gleichzeitige Injektion vor dem Tode und Erkrankung zu schützen.

Versuch XVII.

Immunisierung.

Dauer der Autolyse: 5 Monate; 200 ccm des Filtrats eingeengt auf 50 ccm, Reaktion amphoter.

5 Mäuse erhalten 1 ccm dieser Flüssigkeit und 2 Mäuse 0,5 ccm derselben unter den Rücken injiziert; 7 Stunden darauf erhalten die Tiere sowohl wie 2 Kontrollmäuse die 1 bis 2fache letale Dosis unter die Bauchhaut. Die Kontrolltiere gehen nach 3 Tagen an Tetanus zugrunde, die vorher injizierten Mäuse zeigen keine Krankheitssymptome.

Im gleichen Sinne sprechen die Versuche an Meerschweinchen.

Versuch XVIII.

2 Meerschweinchen von je 350 g und 360 g erhalten unter die Bauchhaut links je 3 ccm dieser autolytischen Flüssigkeit, 7 Stunden darauf unter die Haut des rechten Hinterfußes die 2 bis 3fache letale Dosis; das Kontrolltier geht nach 4 Tagen an Tetanus zugrunde, während die vorbehandelten Meerschweinchen am Leben bleiben, eins davon zeigt geringe Steifigkeit des rechten Hinterbeins, die aber lokal bleibt und zurückgeht, das andere zeigt überhaupt keine Erscheinungen.

Im Anschluß an diese immunisierende Wirkung der autolytischen Lymphdrüsenprodukte mag an die Befunde von Brieger, Kitasato und Wassermann*) erinnert sein, die mit Tetanuskulturen, die auf thymushaltigem Nährmaterial gezüchtet waren, Tiere zu immunisieren vermochten. Es handelte sich aber in diesen Versuchen, wo eine Sterilisation des Nährmediums und somit Abtötung der autolytischen Fermente stattfand, wohl sicher nicht um Wirkung solcher autolytischen Produkte, sondern um Immunisierung mit abgeschwächten Kulturen.

Versuch XIX.

Gleichzeitige Injektion von Toxin und Antitoxin. Dieselbe Flüssigkeit wie im Versuch X.

3 Mäuse erhalten je 1 ccm dieser Flüssigkeit unter den Rücken und die 1 bis 2fache letale Dosis unter die Bauchhaut; während die Kontrolltiere nach 4 Tagen an Tetanus zugrunde gehen, zeigen diese Mäuse keine Krankheitserscheinungen.

Es verhalten sich natürlich in bezug auf diese neutralisierende Wirkung intra corpus die autolytischen Flüssigkeiten entsprechend ihrer verschiedenen giftbindenden Kraft in vitro verschieden; so waren in manchen Versuchen die autolytischen Produkte

---

*) Brieger, Kitasato und Wassermann, Über Immunität und Giftfestigung. Zeitschr. f. Hygiene 12, 37.

imstande, bei gleichzeitiger Injektion von Toxin und Antitoxin vor dem Tode zu schützen; doch machten die Tiere einen leichteren oder schwereren Tetanus durch, während die Kontrolltiere zugrunde gingen.

Nachdem so die antitoxische Kraft der Produkte der Lymphdrüsenautolyse sichergestellt war, wurde versucht, über die Natur und die Eigenschaften der hierbei in Betracht kommenden Substanzen etwas zu erfahren. Versuch XII zeigte, daß ähnlich wie für das Diphtherie- und Tetanusheilserum*) auch hier durch das Chamberlandfilter ein Teil des Schutzstoffes zurückgehalten wird. Die folgenden Versuche ergeben Aufschluß über das Verhalten gegenüber Temperatur, Alkalien und Säuren.

Versuch XX.

Reaktion schwach alkalisch.

Einwirkung der Temp.	Injiziert: Toxin	Injiziert: autolyt. Flüss.	Gewicht der Mäuse	Verlauf
5 Min. bei 56°	10f. let. Dos.	0,5 ccm	21 g	0
	"	0,8 "	19 "	
5 Min. bei 64°	"	0,5 "	13 "	0
	"	0,8 "	15 "	
5 Min. bei 70°	"	0,5 "	20 "	0
	"	0,8 "	18 "	
5 Min. bei 78°. geringe Koagulation	"	0,5 "	20 "	† an Tetanus nach 4 Tagen
	"	0,8 "	21 "	
"	5f. let. Dos.	0,5 "	18 "	† an Tetanus nach 6 Tagen
	"	0,8 "	17 "	† an Tetanus nach 7 Tagen
"	1—2f. let. Dos.	0,5 "	22 "	Tetanus nach 16 Tagen †
	"	0,8 "	22 "	gering. Tetanus, erholt sich
	"	0	24 "	† nach 3 Tagen an Tetanus
5 Min. bei 80°, deutl. starke Koagulation	5f. let. Dos.	0,5 "	18 "	nach 3 Tagen an Tetanus †
	"	0,8 "	19 "	
5 Min. bei 84°, starke Koagulation	1—2f. let. Dos.	0,5 "	22 "	nach 3 Tagen an Tetanus †
	"	0,8 "	20 "	
	"	0	24 "	

Es fällt also die Temperatur, bei der die Wirksamkeit der autolytischen Flüssigkeit aufhört, zusammen mit der Koagulations-

*) Martin, Über das Verhalten von Diphtherieantitoxin bei Filtration mit Chamberlandkerzen. Centralbl. f. Bakteriologie, Abt. I, 20, 796.

temperatur der Eiweißkörper, variiert demgemäß je nach der Konzentration und der Reaktion der Flüssigkeit. Auch das Tetanus- und Diphtherieheilserum widerstehen Temperaturen von 60 bis 65°, bei der Fermente und andere Antikörper, z. B. die Hämolysine zerstört werden. Das Tetanusantitoxin soll nach Behring*) einer Temperatur von 80° widerstehen, während nach anderen Angaben es bei dieser Temperatur seine Wirksamkeit ganz oder doch zum größten Teil verliert**).

Versuch XXI.

Verhalten gegen Säuren und Alkalien.

Während die Toxine der Einwirkung von Säuren und Alkalien gegenüber ziemlich empfindlich sind, sind die Antitoxine resistenter gegen dieselben. Für das Tetanusantitoxin liegen bestimmtere Angaben nicht vor, wohl aber konnte Jakoby***) für das Antiricin zeigen, daß es Einwirkung von Säuren und Alkalien verträgt. Aus der folgenden Versuchsreihe ergibt sich, daß auch die autolytischen Produkte der Lymphdrüsen ihre antitoxische Fähigkeit durch $^1/_2$stündiges Stehen mit Säuren und Alkalien keineswegs einbüßen, wenngleich eine gewisse Abschwächung unverkennbar ist.

a) Einwirkung von Säuren.

5 ccm autolytischer Flüssigkeit (fünfmonatliche Autolyse) werden mit 1 ccm $^n/_{10}$ Schwefelsäure versetzt und nach $^1/_2$ Stunde mit 1 ccm $^n/_{10}$ Natronlauge neutralisiert. Die Prüfung ergab, wenn man der Verdünnung Rechnung trägt, daß das Bindungsvermögen abgenommen hat, aber noch deutlich vorhanden ist.

0,5 ccm der ursprünglichen autolytischen Flüssigkeit neutralisieren die 20fache letale Dosis.

0,5 ccm des neutralisierten Gemisches die 10fache, aber nicht mehr die der Verdünnung entsprechende 15fache.

Substanz	Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf				
	Toxin	autolyt. Flüss.		1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
Autolyt. Filtrat	20—25f. let. Dos.	0,5 ccm	18 g	gesund				
	„	0,8 „	17 „					
	„	0	18 „	—	=	≡†		
Neutralisierte Flüssigkeit	15f. let. Dos.	0,5 „	20 „	0	—	—	=	— erholt sich
	„	0,8 „	21 „	0	norm.			
	„	0	18 „	—	=	†		
„	10f. let. Dos.	0,5 „	22 „	normal				
	„	0,8 „	21 „					
	„	0	22 „	—	- -	≡†		

*) Behring, Die Blutserumtherapie II. — Behring und Frank, Über einige Eigenschaften des Tetanusheilserums. Deutsche med. Wochenschrift 1892, S. 348.

**) Vergleiche hierüber: Duclaux, Traité de microbiologie 2, 213 u. ff.

***) Jakoby, Über Ricinimmunität. Diese Beiträge 1, 51.

b) **Einwirkung von Alkali.**

5 ccm derselben autolytischen Flüssigkeit werden mit 1 ccm $n/_{10}$ Natronlauge versetzt und nach einer $^1/_2$ Stunde mit 1 ccm $n/_{10}$ Schwefelsäure neutralisiert. Die Prüfung ergibt auch hier eine geringe Abnahme der Neutralisationskraft.

Substanz	Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf					
	Toxin	autolyt. Flüss.		1. Tg	2. Tg.	3. Tg.	4. Tg.	5. Tg.	6. Tg.
Neutralisiertes Gemisch	10f. let. Dos.	0,5 ccm	18 g	normal					
	„	0.8 „	19 „						
	„	0	21 „	—	=	≡†			
„	15f. let. Dos.	0,5 „	20 „	0	0	---	—	—	erholt sich
	„	0,8 „	17 „	0	0	0	—	0	
	„	0	18 „	- -	=	†			

Haltbarkeit.

Beim Aufbewahren der autolytischen Produkte unter Toluol im Eisschrank behielten die Flüssigkeiten meist ihre Wirksamkeit vier Wochen und länger, ohne etwas von derselben einzubüßen; manchmal jedoch ging auch ihre Entgiftungsfähigkeit verloren, ohne daß ein Grund hierfür vorzuliegen schien.

Isolierungsversuche.

Die Versuche, mit Alkohol, Alkohol-Äther die wirksame Substanz darzustellen, führten zu keinem Resultate.

Versuch XXII.

20 ccm derselben autolytischen Flüssigkeit wie in Versuch 14 werden mit dem 5fachen Volum 96proz. Alkohols versetzt, der dickflockige Niederschlag sofort auf der Saugpumpe trocken gesaugt und 24 Stunden im Vakuum getrocknet. Der Niederschlag wird mit 10 ccm $^1/_{10}$proz. Natriumkarbonatlösung in der Reibschale zu einer trüben, feinflockigen Flüssigkeit verrieben.

Das Filtrat wird im Vakuum bei einer Temperatur des Wasserbades unter 40° auf 10 ccm eingeengt, mit Wasser auf das ursprüngliche Volum aufgefüllt; die gelbgefärbte Flüssigkeit zeigt keine Biuretreaktion mehr.

0.5 ccm der ursprünglichen Flüssigkeit neutralisieren die 15 bis 20fache letale Dosis.

Substanz	Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf
	Toxin	autolyt. Flüss.		
Alkohol-Niederschlag	10—15f. let. Dos.	0,5 ccm	20 g	† nach $2^1/_2$ Tagen an Tetanus
	„	0,8 „	18 „	
	„	0	18 „	
Filtrat der Alkoholfällung	„	0,5 „	19 „	† nach 3 Tagen an Tetanus
	„	0,8 „	19 „	
	„	0	18 „	† nach $2^1/_2$ Tagen an Tetanus

Ein ähnliches negatives Resultat ergab die Alkoholätherfällung.

Versuch XXIII.

20 ccm derselben autolytischen Flüssigkeit wie bei der Alkoholfällung waren mit 110 ccm eines Gemisches von Alkohol und Äther zu gleichen Teilen versetzt, der Niederschlag sofort abgesaugt, im Vakuum getrocknet und wie der Alkoholniederschlag behandelt; das Filtrat im Vakuum mit 10 ccm eingeengt. Die Resultate sind denen der Alkoholfällung gleich.

Sprach schon die Beeinflussung der entgiftenden Substanz durch die Temperatur dagegen, daß es sich bei ihr um Substanzen von den Eigenschaften des Cholesterins, Lecithins oder ähnlicher Körper handeln konnte, so gestatten die Ergebnisse der Alkohol- und Alkohol-Ätherfällung eine solche Vermutung vollständig auszuschließen*). Auch bei den antitoxischen Sera, dem Diphtherie- und Tetanusheilserum, hatte sich die Fällung mit Alkohol, Alkohol-Äther, Azeton usw. als gänzlich unbrauchbar erwiesen. [Brieger und Boer, Freund und Sternberg**).] Es gelang mir auch nicht mit Hilfe der Uranylazetatfällung, die sich zur Isolierung vieler Fermente als vorteilhaft gezeigt hatte, [Jakoby***), Rosell†)], die Entfernung der Eiweißkörper und die Darstellung wirksamer Präparate zu erzielen, trotzdem die Fällung bei verschiedenen Alkaleszenzgraden vorgenommen wurde.

Versuch XXIV.

30 ccm derselben autolytischen Flüssigkeit wie in Versuch XIII werden mit Uranylazetat gefällt, die Reaktion mit Natriumkarbonat unter Vermeidung eines Überschusses sorgfältig alkalisch gehalten; der Niederschlag wird zentrifugiert, auf einem kleinen gehärteten Filter trocken gesaugt und mit 10 ccm ½ proz. Sodalösung extrahiert; derselbe zeigte keine Spur von neutralisierender Wirkung.

Substanz	Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf
	Toxin	autolyt. Flüss.		
Uranyl-azetatniederschlag	10f. let. Dos.	0,5 ccm	15 g	† nach 2½ Tagen an Tetanus
	„	0,8 „	13 „	
	„	0	15 „	
	0	0,8 „	14 „	0 gesund
„	1—2f. let. Dos.	0,5 ccm	14 g	† nach 4 Tagen an Tetanus
	„	0,8 „	13 „	
	„	0	13 „	

*) S. u. a. P. Th. Müller, Geht das Tetanolysin mit den Proteiden des Serums und des Eierklars eine Giftbindung ein? Centralbl. f. Bakteriologie 34, 567.

**) A. a. O.

***) Jakoby, Über das Aldehyde oxydierende Ferment der Leber und Nebenniere. Zeitschr. f. physiol. Chemie 30, 136.

†) Rosell, Über Nachweis und Verbreitung intracellulärer Fermente. Inauguraldissertation Straßburg.

E. P. Pick*) war es auch nicht gelungen, auf diese Art Diphtherie- und Tetanusantitoxin eiweißfrei zu machen und auch Jakoby**) versagte die Methode bei Versuchen der Reinigung des Antiabrins.

Es wurde daher versucht, mit Hilfe der Salzfällung ähnlich den Versuchen Buchners, Briegers und seiner Schüler, Ehrlichs, Wassermanns und Tizzonis***) wenigstens einen Teil der beigemengten, bei der Autolyse entstandenen Produkte zu entfernen und auf diesem Wege eine Anreicherung der Schutzstoffe zu erzielen.

Sättigung mit Kochsalz in Substanz bei einer Temperatur von 30 bis 37°, wobei die Flüssigkeit einen geringen weißen, flockigen Niederschlag ausfallen läßt, führt auch in eingeengten Lösungen nicht zur Fällung der giftbindenden Stoffe.

Versuch XXV.

20 ccm eingeengter autolytischer Flüssigkeit, von der 0,5 ccm die 20fache letale Dosis zu neutralisieren vermögen, werden mit Kochsalz gesättigt, 20 Stunden bei 37° im Brutschrank gelassen, der Niederschlag abgesaugt, mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und in 10 ccm Wasser gelöst.

Substanz	Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf
	Toxin	autolyt. Flüss.		
Kochsalz-niederschlag	10—15f. let. Dos.	0,5 ccm	19 g	† nach 1½ Tagen an Tetanus
	"	0,8 "	18 "	† nach 1½ Tagen an Tetanus
	"	0	22 "	† nach 1½ Tagen an Tetanus
	0	0,8 "	17 "	gesund

Das gleiche Resultat zeigte die Untersuchung des Niederschlags nach Sättigung der Flüssigkeit mit Salpeter, der Niederschlag ist viel reichlicher als bei Sättigung mit Kochsalz, doch läßt sich auch in ihm keine giftbindende Substanz nachweisen.

Versuch XXVI.

20 ccm derselben autolytischen Flüssigkeit wie im vorigen Versuch werden mit Salpeter gesättigt, 18 Stunden im Brutschrank bei 30° gelassen und der Niederschlag trocken gesaugt, derselbe wird in 10 ccm Wasser gelöst.

*) E. P. Pick, a. a. O.
**) Jakoby, Diese Beiträge 1, 51.
***) A. a. O.

Substanz	Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf
	Toxin	autolyt. Flüss.		
Salpeter-Niederschlag	10—15f. let. Dos.	0,5 ccm	17 g	† nach 1½ Tagen an Tetanus
	„	0,8 „	18 „	† nach 1½ Tagen an Tetanus
	„	0	22 „	
	0	0,8 „	17 „	bleibt gesund

Besseren Erfolg hatte die Ausfällung mit Magnesiumsulfat bei einer Temperatur von 30°; mit Hilfe dieses Aussalzungsverfahrens war es ja auch Tizzoni*) gelungen, sein Tetanus-Antitoxin aus Hundeserum zu fällen. Doch ist die Fällung eine unvollständige; auch in eingeengter autolytischer Flüssigkeit entgehen über 50 Proz. der Fällung.

Versuch XXVII.

20 ccm der gleichen autolytischen Flüssigkeit wie in den vorhergehenden Versuchen werden mit Magnesiumsulfat in Substanz gesättigt, 18 Stunden im Brutschrank bei 30° gelassen, der Niederschlag abgesaugt, mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung gewaschen und trocken gesaugt. Derselbe wird in 10 ccm Wasser zur Lösung gebracht.

Substanz	Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf						
	Toxin	autolyt. Flüss.		1. Tg.	2. Tg.	3. Tg.	4. Tg.	5. Tg.	6. Tg.	7. Tg.
Magnesium-sulfatniederschlag	20—25f. let. Dos.	0,5 ccm	22 g	0	0	—	=	≡	†	
	„	0,8 „	20 „	0	0	—	=	≡	≡	bleibt am Leben
	„	0	22 „	—	≡†					
	0	0,8 „	16 „	gesund						
„	12—15f. let. Dos.	0,5 „	19 g	0	0	—	—	=	=	† nach 14 Tag.
	„	0,8 „	18 „	0	0	—	—	—	bleibt am Leben	
	„	0	20 „	—	=†					
„	5—8f. let. Dos.	0,5 „	18 „	0	0	—	—	0	0	
	„	0,8 „	19 „	0	0	—	0	0	0	
	„	0	17 „	—	=	†				

Im Filtrat der Fällung läßt sich dementsprechend durch Fällung mit Ammonsulfat der Rest der giftbindenden Substanz nachweisen. Das Filtrat wird mit einem Volum gesättigter, exakt neutralisierter Ammonsulfatlösung versetzt, der geringe Niederschlag in 10 ccm Wasser gelöst.

*) Tizzoni, a. a. O.

Versuch XXVIII.

Substanz	Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf					
	Toxin	autolyt. Flüss.		1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
Filtrat der Magnesiumsulfatfällung, Ammonsulfatniederschlag	10–15f. let. Dos.	0,5 ccm	18 g	0	—	=	≡	†	
	"	0,8 "	16 "	0	0	—	≡	≡	†
	"	0	22 "	—	≡†				
	0	0,8 "	15 "	bleibt gesund					
"	5–8f. let. Dos.	0,5 ccm	14 "	0	—	—	0	0	
	"	0,8 "	17 "	0	0	0	—	0	
	"	0	16 "	—	≡	†			

Als das vorteilhafteste Aussalzungsverfahren erwies sich Aussalzung mit Ammonsulfat. Benutzt wurde hierzu eine gesättigte, genau (bei entsprechender Verdünnung) gegen Lakmoid neutralisierte Lösung. Entsprechend den Erfahrungen über Aussalzung waren die Fällungsgrenzen verschieden je nach der Konzentration und Reaktion der Ausgangslösung.*)

Während anfangs das eingeengte Filtrat zur Ausfällung benutzt wurde, wurde später das Filtrat direkt benutzt, da ein Teil der Substanzen beim Einengen unlöslich wird und nicht mehr zur Lösung gebracht werden kann. Bei der Konzentration des Filtrats auf das 4fache zeigte es sich, daß die giftbindende Substanz je nach der Reaktion der Ausgangsflüssigkeit bei einem Gehalt von 42 bis 50 Proz. an Ammonsulfat ausgefällt war; wenigstens ließ sich durch weiteren Zusatz von Ammonsulfatlösung keine antitoxisch wirkende Substanz mehr nachweisen.

Versuch XXIX.

20 ccm der gleichen autolytischen Flüssigkeit wie in Versuch XXV werden mit 15 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, so daß die Salzkonzentration etwa 43 Proz. erreicht. Die Flüssigkeit läßt einen sehr feinflockigen, nicht sofort abfiltrierbaren Niederschlag ausfallen; sie wird daher 3 bis 4 Stunden zentrifugiert und der Bodensatz nach Abgießen der klaren darüberstehenden Flüssigkeit auf einem gehärteten Filter nach Auswaschen mit gesättigter Ammonsulfatlösung trocken gesaugt; der Niederschlag wird in 20 ccm Wasser gelöst.

Das Filtrat wird mit 2 Volumen Ammonsulfatlösung versetzt, der spärliche Niederschlag in der gleichen Weise trocken gesaugt und in 5 ccm Wasser gelöst zur Prüfung verwendet.

*) Vgl. Spiro, Die Fällung von Kolloiden. Diese Beiträge 4, 300.

Substanz	Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf
	Toxin	autolyt. Flüss.		
Ammon-sulfatnieder-schlag bei 43 proz. Sättigung	20f. let. Dos.	0,2 ccm	18 g	bleiben gesund
	„	0,5 „	18 „	
	„	0,8 „	17 „	
	„	0	19 „	† an Tetanus nach 1½ Tagen
	0	0,8 „	16 „	gesund
Ammon-sulfatnieder-schlag des Filtrats	10—15f. let. Dos.	0,5 „	16 „	† an Tetanus nach 2½ Tagen
	„	0,8 „	18 „	
	„	0	19 „	
	0	0,8 „	17 „	gesund

Ähnliche Versuche wurden wiederholt immer mit dem gleichen Erfolg angestellt. Bei Verwendung des Filtrats ohne vorherige Konzentration zur Prüfung der Fällungsgrenzen zeigten sich diese wesentlich verschoben, so daß auch bei Halbsättigung mit Ammonsulfat keineswegs eine vollständige Fällung erzielt wurde. Es wurde daher in diesem Falle immer die Salzkonzentration auf ²/₃ Sättigung gebracht.

Versuch XXX.

110 ccm des Filtrats einer 4 monatlichen Lymphdrüsenautolyse werden mit dem gleichen Volum gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, der Niederschlag abzentrifugiert, auf einem gehärteten Filter gesammelt und nach Waschen mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung trocken gesaugt; derselbe wird in 10 ccm Waser gelöst. Die Lösung erfolgt leicht zu einer dunklen, neutral reagierenden Flüssigkeit.

Substanz	Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf					
	Toxin	autolyt. Flüss.		1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
Ammon-sulfatnieder-schlag bei 50 proz. Sättigung	10—15f. let. Dos.	0,1 ccm	18 g	gesund					
	„	0,2 „	20 „						
	„	0,5 „	19 „						
	„	0,75 „	20 „						
	„	0	20 „	† nach 48 Stunden an Tetanus					
	0	0,75 „	17 „	gesund					
Ammon-sulfatnieder-schlag im Filtrat d. vor-hergehenden Fällung	5f. let. Dos.	0,5 „	22 „	0	0	—	=	=	erholt sich
	„	0,8 „	20 „	0	0	0	=	=	
	„	0	17 „	0	=	= †			
	0	0,8 „	20 „	gesund					
„	1—2f. let. Dos.	0,5 „	18 „	bleiben gesund					
	„	0,8 „	18 „						
	„	0	22 „	† nach 4 Tagen an Tetanus					

0,1 ccm hiervon vermögen gegen die 10 bis 15fache letale Dosis zu schützen. Das Filtrat des Niederschlags wird mit dem gleichen Volumen Ammonsulfatlösung versetzt, der Niederschlag in ähnlicher Weise abzentrifugiert und trocken gesaugt, in 10 ccm Wasser gelöst.

Es mag hier erwähnt sein, daß zuweilen aus mir bis jetzt unerklärlichen Gründen bei der Ammonsulfatfällung die Wirksamkeit leidet, so daß entweder nicht der volle Gehalt an Schutzstoffen gewonnen wird, oder auch daß die Schutzwirkung bei gleichzeitiger Injektion mit dem Toxin bei der Neutralisation im Tierkörper herabgesetzt ist, obwohl sie bei der Ausgangsflüssigkeit deutlich vorhanden war.

Wie zu erwarten, gab die Lösung der Ammonsulfatfällung deutliche Eiweißreaktionen. Um die anhaftenden Eiweißkörper zu entfernen, wurde versuchsweise die Verdauung mit Trypsin in Anwendung gebracht. Es war auf diesem Wege, wie schon erwähnt, Jakoby*) gelungen, Ricin von dem anhaftenden Eiweiß zu befreien; doch vermochte er das Antiricin auf diesem Wege nicht zu reinigen, und auch die Versuche E. P. Picks**) mit Diphtherieantitoxin bei Anwendung der gleichen Methode schlugen fehl. Auch aus den folgenden Experimenten geht hervor, daß die antitoxisch wirkende Substanz der Lymphdrüsenautolyse durch Trypsinverdauung vernichtet wird. Ob hieraus auf die Eiweißnatur des Schutzstoffs geschlossen werden darf, wie dies für die Antitoxine getan worden ist, sei dahin gestellt, da bekanntlich auch andere Substanzen dem Trypsin einen Angriffspunkt zur Aufspaltung bieten***).

Versuch XXXI.

10 ccm der Ammonsulfatfällung, wie sie im Versuch XXIX benutzt wurde, werden mit dem gleichen Volum $^1/_2$ proz. Karbonatlösung und einer Messerspitze wirksamen Trypsins Grübler versetzt und unter Toluol in den Brutschrank gestellt; als Kontrolle hierzu dienten 10 ccm derselben

a) Prüfung nach 4 Tagen.

Zur Prüfung verwendete Substanz	Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf						
	Toxin	antolyt. Flüss.		1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag
Lösung der Ammonsulfatfällung + Trypsin	10—15f. let. Dos.	0,5 ccm	19 g	0	0	—	=	=	≡	† nach 14 Tag.
	„	0,8 „	16 „	0	0	—	=	=	=	erholt sich
Kontrollprobe	„	0,5 „	17 „	bleiben ges.						
	„	0,8 „	15 „							
	„	0	18 „	—	=	†				

*) Jakoby, Archiv f. experim. Pathologie u. Pharmakol. 46, 28.

**) E. P. Pick, a. a. O.

***) Schwarzschild, Zur Kenntnis der Trypsinwirkung. Diese Beiträge 4, 155.

Lösung mit dem gleichen Volum Sodalösung, die mit Toluol in dem Brutschrank aufbewahrt wurden. Nach 4 Tagen war die Biuretreaktion noch deutlich, die antitoxische Kraft hatte jedoch schon abgenommen, nach 8 Tagen, wo ebenfalls die Biuretreaktion, wenn auch schwach, so doch noch vorhanden war, war überhaupt keine oder doch nur eine sehr geringe Menge an schützenden Substanzen vorhanden, während die Kontrollprobe dieselbe noch deutlich zeigte.

b) nach 8 Tagen.

Zur Prüfung verwendete Substanz	Injiziert		Gewicht der Mäuse	Verlauf						
	Toxin	autolyt. Flüss.		1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag
Lösung + Trypsin	10f. let. Dos.	0,5 ccm	17 g	0	—	=	≡†			
	„	0,8 „	18 „	0	—	=	≡†			
Kontrollprobe	„	0,5 „	18 „	bleiben ges.						
	„	0,8 „	14 „							
	„	0	16 „	=	≡†					
Lösung + Trypsin	4f. let. Dos.	0,5 „	18 „	0	—	=	=	≣	†	
	„	0,8 „	15 „	0	—	=	=	≣	=	†
	„	0	19 „	—	=	≡	†			
„	1—2f.let.Dos.	0,5 „	17 „	—	=	≡	≡	≣	†	
	„	0,8 „	16 „	0	=	=	≡	≡†		
	„	0	14 „	—	≡	†				

Über die Art der Einwirkung der autolytischen Flüssigkeit auf das Toxin habe ich nur spärliche Versuche gemacht; die Tierversuche zeigten jedoch insofern eine Analogie mit der Wirkung des Tetanusantitoxins auf das Tetanustoxin, als auch hier Dosen, die für Mäuse keine Krankheitserscheinungen mehr bedingen, noch deutlich Symptome der Vergiftung bei Meerschweinchen hervorriefen, wie dies Buchner*) zuerst zeigen konnte und Roux und Vaillard**) in Versuchen bei Tieren, die vorher mit Massouahvibrionen immunisiert waren, bestätigen konnte.

Versuch XXXII.

1,2 ccm Toxinlösung = 18 bis 24fache tödliche Dosen (für Mäuse) werden im Reagenzglase mit 9 ccm eingeengter autolytischer Flüssigkeit (die schwache Schutzkraft besaß) gemischt. 3 Mäuse erhalten hiervon je 1 ccm und bleiben normal. Die Kontrollmaus geht mit der entsprechenden Giftdosis nach 4 Tagen an Tetanus zugrunde. 2 Meerschweinchen von je 490 g und 500 g erhalten von demselben Gemisch je 3,4 ccm subkutan, die Toxindosis entspricht etwa der 6 bis 8fachen letalen für Meerschweinchen; das Kontrolltier geht nach 48 Stunden an Tetanus zugrunde, die beiden Tiere zeigen deutlich lokalen Tetanus, geringe Steifigkeit, erholen sich aber nach 4 Tagen wieder.

*) Buchner, Über Bakteriengifte und Gegengifte. Münch. med. Wochenschr. 1893, S. 480.

**) Roux, Sur les sérums antitoxiques. Annales de l'Institut Pasteur 8, 724.

B. Versuche mit Kobragift.

Die entgiftende Wirkung, die die autolytischen Produkte von Lymphdrüsen gegenüber Tetanustoxin aufweisen, ließ an die Möglichkeit denken, daß sie sich auch für andere Toxine und ähnlich wirkende Gifte wirksam erweisen würden. In erster Linie wurde hierbei die Wirksamkeit auf Kobragift geprüft. Calmette*) konnte feststellen, daß Antitetanusserum Schlangengift unwirksam macht, während umgekehrt Serum gegen Schlangengift keine Wirkung auf Tetanustoxin äußert. Krauss**) stellt allerdings diese Wirkung des Tetanusantitoxins in neuester Zeit in Abrede. Wie aus den folgenden Versuchen hervorgeht, äußerten die autolytischen Lymphdrüsenprodukte keine entgiftende Wirkung auf das Kobragift.

Als Versuchstiere dienten Meerschweinchen, die letale Dosis, um ein Tier in 12 bis 15 Stunden zu töten, war etwa $^1/_{10}$ bis $^1/_{12}$ mg (frische wässerige Lösung).

Versuch XXXIII.

Lymphdrüsen, $4^1/_2$ Mon. autolysiert. 160 ccm auf 40 ccm eingeengt. Reaktion amphoter.

Injiziert		Gewicht der Meerschweinchen	Verlauf
Gift	autolyt. Flüss.		
4—5f. let. Dos.	3,0 ccm	350 g	† nach 7 Stunden
„	4,0 „	320 „	
„	0	320 „	

Mehrfache Wiederholung der Versuche ergab dieselben negativen Resultate.

C. Versuche mit Diphtherietoxin.

Als Versuchstiere wurden Meerschweinchen, womöglich zwischen 300 und 400 g angewandt; der Toxintod wurde durch die Sektion: blutige Verfärbung der Nebennieren und Exsudate kontrolliert.

Versuch XXXIV.

Lymphdrüsen vom Rinde, 7 Monate 16 Tage autolysiert. Flüssigkeit nicht eingeengt. Reaktion schwach alkalisch.

Injiziert		Gewicht der Meerschweinchen	Verlauf
Toxin	autolyt. Flüss.		
10—15f. let. Dos.	5 ccm	360 g	† nach 40 Stunden; typischer Sektionsbefund
„	10 „	356 „	
„	15 „	380 „	
„	0	375 „	

*) Calmette, a. a. O.

**) Krauss, Über ein akutwirkendes Bakterientoxin. Centralblatt für Bakteriologie, Abt. I, 34, 496.

Ebensowenig erwies sich das eingeengte Filtrat einer viel kürzer dauernden Autolyse wirksam, auch hier zeigte sich keine Spur von entgiftender Wirkung.

Versuch XXXV.

Lymphdrüsen vom Rinde, 28 Tage autolysiert. 400 ccm auf 100 ccm eingeengt. Reaktion amphoter.

Injiziert		Gewicht der Meerschweinchen	Verlauf
Toxin	autolyt. Flüss.		
5f. let. Dos.	4 ccm	320 g	† nach 48 Stunden mit typischem Sektionsbefunde
„	5 „	340 „	
„	6 „	310 „	
„	0	380 „	

Auch das Produkt der Ammonsulfatfällung war gänzlich ohne Wirkung.

Versuch XXXVI.

Ammonsulfatfällung von Lymphdrüsenautolyse, 66 proz. Sättigung, $5^1/_2$ Mon. autolysiert. Reaktion neutral.

Injiziert		Gewicht der Meerschweinchen	Verlauf
Toxin	autolyt. Flüss.		
1—2f. let. Dos.	2 ccm	310 g	† nach 3 Tagen mit typischem Sektionsbefunde
„	3 „	375 „	
„	0	375 „	

Versuch XXXVII.

Rinderleber, 9 Mon. 14 Tage autolysiert. 100 ccm auf 40 ccm eingeengt. Reaktion alkalisch.

Injiziert		Gewicht der Meerschweinchen	Verlauf
Toxin	autolyt. Flüss.		
10f. let. Dos.	2 ccm	550 g	† nach 36 Stunden mit typischem Sektionsbefunde
„	4 „	565 „	
„	0	560 „	

Versuch XXXVIII.

Rindermilz, 8 Mon. 6 Tage autolysiert. 100 ccm auf 50 ccm eingeengt. Reaktion amphoter.

Injiziert		Gewicht der Meerschweinchen	Verlauf
Toxin	autolyt. Flüss.		
10f. let. Dos.	5 ccm	325 g	† nach 36 Stunden; Toxintod
„	10 „	340 „	
„	0	335 „	



Versuch XXXIX.

Hundemilz, 3 Mon. autolysiert. Flüssigkeit nicht eingeengt. Reaktion amphoter.

Injiziert		Gewicht der Meerschweinchen	Verlauf
Toxin	autolyt. Flüss.		
1—2f.let.Dos.	3 ccm	380 g	Toxintod nach 48 Stunden
„	5 „	350 „	
„	0	350 „	

Versuch XL.

Pferdemilz, $4^1/_2$ Mon. autolysiert. 200 ccm auf 60 ccm eingeengt. Reaktion schwach alkalisch.

Injiziert		Gewicht der Meerschweinchen	Verlauf
Toxin	autolyt. Flüss.		
1—2f.let.Dos.	2 ccm	420 g	Toxintod nach 3 Tagen
„	4 „	280 „	
„	0	270 „	
„	0	235 „	

Es ergibt sich aus den vorhergehenden Versuchen, daß bei der Autolyse der untersuchten Organe keine Stoffe auftreten, die Diphtherietoxin entgiften. Bedenkt man aber, daß nur eine geringe Zahl von Organen zur Untersuchung kam und nur wenige Stadien der autolytischen Wirkung untersucht wurden, so ist die Möglichkeit keineswegs von der Hand zu weisen, daß bei Ausdehnung der Untersuchungen vielleicht ein ähnlicher Befund erhoben werden kann, wie für die autolytischen Produkte der Lymphdrüsen gegenüber Tetanustoxin. Die Tatsache, daß letztere Produkte nur gegen Tetanusgift, nicht aber gegen andere Gifte wirksam sind, hat bei der Spezifizität der Antitoxine nichts auffallendes.

Was die Wirksamkeit der autolytischen Spaltungsprodukte von Lymphdrüsen anbelangt, so ist die Frage zu erwägen, ob eine Identität derselben mit dem Tetanusantitoxin vorliegt, so daß Schlüsse auf die Abstammung und Bildung der letzteren gezogen werden könnten. Der quantitative Unterschied in der antitoxischen Wirkung zwischen Serum und autolytischen Produkten spricht an sich nicht dagegen, wenn man bedenkt, daß der chemische Abbau der untergegangenen Zellen im Organismus bedeutend rascher vor sich geht, als bei der antiseptischen Autolyse (die Verhältnisse der aseptischen Autolyse zeigen dies aufs deutlichste), andererseits geht im Organismus Absterben der

Zellen mit dem Entstehen neuer Hand in Hand, so daß immer frisches Material zur Verfügung steht, während wir es bei der Autolyse in vitro mit einer einzigen, von vornherein beschränkten Menge von Produkten zu tun haben.

Wenn auch die Eigenschaften der autolytischen Produkte, ihre Empfindlichkeit gegen viele Agentien, ihre Resistenz gegenüber einer Temperatur über 60° und Vernichtung durch solche von 80°, das Verhalten bei der Einwirkung von Säuren und Alkalien, bei der Filtration durch die Chamberlandkerzen denen des antitoxischen Serums gleich sind, so wäre es verfrüht, hieraus einen Rückschluß auf die Identität der Substanzen zu machen; ein solcher wird erst möglich sein, wenn man einer Reindarstellung beider näher gekommen sein wird, und ihre Eigenschaften sich auch dann als identisch erweisen werden.

Jedenfalls läßt die Bildung solcher antitoxischer Substanzen, wie sie im vorliegenden für das Tetanustoxin sich ergeben haben, die Möglichkeit berücksichtigen, daß auch der intravitalen Autolyse eine Rolle bei der Bildung dieser Körper zukommt. Eine Erklärung für die Spezifizität der Antikörper ist hierbei bei den unendlichen Variationen, die sich je nach den zur Autolyse gelangenden Körperzellen und je nach der Tiefe des Abbaus ergeben, sehr gut möglich; doch bedarf es zur Sicherstellung dieses Schlusses und zu seiner Verallgemeinerung des Nachweises, daß bei der Autolyse außer den antitoxischen Substanzen gegen Tetanus auch noch solche gegen andere Gifte auftreten.

XI.

Der Einfluß einiger gerinnungshemmender Agentien auf das Vogelplasma.

Von Dr. **Ernst Fuld,**
Assistenten am pharmakologischen Institut zu Halle
und
Dr. **Karl Spiro,**
Privatdozenten und Assistenten am physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Die nachstehend mitgeteilte Untersuchung*) gliedert sich in folgende Abschnitte: 1. das Zeitgesetz des Geflügelpeptonplasmas; 2. die Wirkung des Blutegelextraktes auf das Geflügelplasma; 3. die Wirkung des Peptonserums von Säugetieren auf das Geflügelplasma.

Nachdem es gelungen war, für die Gerinnung des Vogelbluts mit Gewebsextrakt eine ziemlich weitgehende Gesetzmäßigkeit nachzuweisen[1]), schien es geboten, den Einfluß einiger gerinnungshemmender Agentien auf dieses relativ übersichtliche Objekt zu prüfen, um aus den hierbei hervortretenden quantitativen Ver-

---

*) Die ersten einschlägigen Versuchsreihen sind während der Osterferien 1902 im physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg angestellt mit Unterstützung von Herrn H. Schneider, dem wir hiermit unsern besten Dank aussprechen. Die von dem einen von uns (F.) in Halle ausgeführte Berechnung der Versuchsresultate machte eine Vervollständigung der Untersuchung nötig. Die Veröffentlichung verzögerte sich teils aus äußeren Gründen, teils weil die Ergebnisse zunächst paradox schienen. Erst nach der Niederschrift wurden wir mit den Resultaten der Arbeit von Morawitz[2]) bekannt, die mannigfache Berührungspunkte und Übereinstimmungen mit den unseren aufwiesen. Wir glaubten jedoch dieser Übereinstimmung der naturgemäß gänzlich voneinander unabhängigen Ausführungen keinen Eintrag zu tun, wenn wir insbesondere in der vorläufig gewählten Terminologie keine Annäherungsversuche machten, um so weniger, als Grund zu der Annahme ist, daß eine definitive Nomenklatur weder hier noch dort geboten werden konnte.

änderungen Rückschlüsse auf ihren Angriffspunkt zu ziehen und so vielleicht einen näheren Einblick in den Gerinnungsvorgang zu gewinnen.

I. Das Zeitgesetz des Peptonplasmas.

Besonders geboten schien hier die Prüfung der von Délezenne[3]), sodann Ellinger und dem einen von uns[4]) und schließlich von Spangaro[5]) konstatierten Peptonwirkung. In unserer Absicht lag es, zu untersuchen, ob und wie die Muskelextrakte, und wie das Plasma von denen normaler Tiere verschieden wären. Da jedoch der in der Wunde verbliebene Blutanteil von selbst gerann, untersuchten wir zunächst die Wirkung des Muskelsaftes auf das Plasma des gleichen Versuchstieres.

Zu diesem Versuche wurde Blutplasma von einer 8pfündigen Gans benutzt, der nach 24stündigem Hungern 0,5 g Wittepepton pro Kilo als 25proz. Lösung in die Vena jugularis injiziert worden war. Nachdem die Wirkung der Injektion durch den röchelnden Charakter der Atmung, die reichliche Salivation, den soporösen Zustand des Tieres und die venöse Hyperämie konstatiert war, geschah die Entnahme des Blutes aus der Karotis eine Viertelstunde nach der Injektion. Dabei erwies sich der Blutdruck bedeutend herabgesetzt.

Bei der Entnahme und weiteren Behandlung wurden die Vorschriften Délezennes in der früher beschriebenen Weise beobachtet, ebenso auch bei Ausführung der Gerinnungsversuche.

Das Plasma war durch einmaliges dreistündiges Zentrifugieren gewonnen, während der für spätere Versuche bestimmte Anteil je 2mal während im ganzen 4 Stunden zentrifugiert wurde. Der Muskelauszug wurde durch Zerreiben des Muskels mit Quarzsand in 0,9proz. Kochsalzlösung gewonnen und vor der Verwendung filtriert. Die Temperatur des Wasserbads betrug 34,5° C.

Die unten verzeichneten Extraktmengen wurden mit Kochsalzlösung von 0,9 Proz. auf 0,5 ccm aufgefüllt und jedesmal 1 ccm Plasma auf den Metronomschlag 0 in die Mischung scharf eingeblasen. Der eine von uns beobachtete das Gläschen, während der andere mit Metronom und Rennuhr die Zeit bestimmte.

Folgende weiteren Verbesserungen der Methodik dürften namentlich für einen einzelnen Arbeiter bemerkenswert sein.

Der Eintritt der Gerinnung kann selbst bei höchst unvollständiger Koagulation mit Bildung lockerer und durchsichtiger Flocken an der Bewegung aufgestreuter Paraffinstäubchen (hergestellt mit einem Reibeisen) konstatiert werden; diese werden im leise geschaukelten oder gedrehten Glas in ihrer Lage gegeneinander von dem ersten Gerinnsel fixiert, während Paraffin an sich nicht benetzt wird und (wie auch besonders festgestellt wurde) die Gerinnungsdauer nicht beeinflußt*).

*) Das Verfahren ist aus einem Vorschlag in der Milchzeitung zur Labbestimmung mit Hilfe von feinem Ruß hervorgegangen.

Extrakt ccm	Zeit bis zur Gerinnung	berechnet nach der Formel $\frac{\log \xi}{\log \eta} = C$
	1.	
0,1	34"	(34")
0,2	22"	(22 3/5")
0,4	15(,5)"	(15,1")
	2.	
0,0125	100"	(100)
0,025	70"	(66 2/3)
0,050	45"	(44,4)
0,075	36"	(36,4)
	3.	
1/32 0,031	200"	(200)
1/64 0,016	520"	(300)

In den Versuchen 2 und 3 wurden Verdünnungen des Extrakts aufs Zehnfache angewendet.

Es geht aus der vortrefflichen Übereinstimmung zwischen gefundenen und berechneten Zahlen der Versuche 1 und 2 wie auch aus den Abweichungen in Versuch 3 hervor, daß ein Unterschied gegen das Verhalten normaler Tiere nicht besteht. Zu ganz dem gleichen Resultat führte ein Versuch am Huhn.

Huhn von 1640 g erhält 6 ccm 25proz. Peptonlösung in die größere (rechte) Jugularvene; sämtliche Erscheinungen, wie oben berichtet, auffällig die blaue Farbe des Kammes. Blut zweimal zentrifugiert. Wasserbadtemperatur 33,7°.

ccm		(ber.)
0,1	72"	(72")
0,2	48"	(48")
0,4	32—33"	(32")
0,6	27"	(25 1/2")

Vorausgehende Versuche gaben analoge Werte, konnten jedoch wegen Ungenauigkeit des Metronoms nicht aufgenommen werden.

Es scheint also nicht, als ob eine merkliche Menge des zugeführten wirksamen Prinzips im Peptonplasma zerstört oder gebunden würde, um so weniger, als auch Versuche mit geringer Plasmamenge außerhalb der Gültigkeit des Zeitgesetzes durchaus analog verlaufen wie beim normalen Tier.

Wie die von den früheren Beobachtern festgestellte Peptonwirkung am Vogelblut zu erklären ist, bleibt nach diesen Versuchen völlig dunkel, zumal auch die spontane Gerinnung der Proben keineswegs später eintritt, als sonst (nach etwa 10 Tagen).

Die umgekehrte Frage aber wird man nicht abweisen können: sollte nicht eine Ähnlichkeit bestehen zwischen der Gerinnung des reinen Vogelplasmas (oder Vogelpeptonplasmas) mit derjenigen des Peptonbluts vom Hunde? Durch die Untersuchungen Wool-

dridges und anderer wissen wir, daß Muskel- oder überhaupt Organextrakte das Peptonblut zur Gerinnung bringen, während Fibrinfermentlösungen meistens ohne Wirkung auf dasselbe bleiben. Manche Serumarten (z. B. vom Schaf) allerdings bringen dasselbe ohne weiteres zur Gerinnung, was aber nicht an deren Fermentgehalt liegt (Wooldridge). Von der Richtigkeit aller dieser Tatsachen überzeugten wir uns wiederholt und es sei auf die Ausführungen des einen von uns[4]) hingewiesen.

In ganz analoger Weise ergab sich[1]), daß Geflügelblutplasma nicht immer von allen Serumarten koaguliert wurde, wobei seiner Zeit schon hervorgehoben wurde, daß es fraglich sei, ob hierfür das dem eigenen Blut gegenüber wirksame Fibrinferment in Aktion trete*).

Auch die zeitlichen Verhältnisse der Gerinnung mit verschiedenen Extraktmengen widersprechen den beim Vogelblut ermittelten nicht, wenn es auch trotz vieler Bemühungen und verbesserter Methodik nicht gelang, gleichmäßige Resultate zu erzielen.

Die Extrakte verloren ihre Wirksamkeit nach dem Aufkochen.

Nach den Arbeiten von Arthus[7]) schien es von hohem Interesse, zu prüfen, wie sich die verglichenen Gerinnungen gegen Fluornatriumzusatz verhalten.

Daß die Gerinnung des Geflügelblutes mit Muskelextrakt sowohl wie mit Serum durch dieses Reagens vollkommen hintangehalten wird, wurde bereits mitgeteilt[1]).

Genau das gleiche gilt für Peptonplasma vom Hund, gleichgültig ob das Kältepräzipitat erzeugt und entfernt war oder nicht.

Nach den Angaben von Arthus kann es nun keinem Zweifel unterliegen, daß wenigstens die Gerinnung des Hundepeptonplasmas als von hineingebrachtem echtem Fibrinferment unabhängig anzusehen ist. Auch bewirkt ja das Fibrinferment nur schwer Gerinnung in Peptonplasma.

Es scheint nun zunächst auch die Annahme unhaltbar, daß die Organextrakte zymoplastische Substanz enthalten, aus folgenden Gründen:

1. Die Gerinnung der Plasmaprobe müßte dann ausschließlich mit Hilfe des beschränkten in ihr enthaltenen Zymogenvorrates geschehen. Danach müßte die Aktivierung einer hinreichenden Prothrombinmenge der Fermentwirkung vorausgehen. Nun erscheint die beobachtete Gerinnungszeit hierfür zu kurz.

2. Wie Versuche ergaben, hat die Anwesenheit von Fluornatrium keinen Einfluß auf die Bildung des Ferments aus seiner

*) Dieser Zweifel erwies sich in der Folge als völlig berechtigt.

durch NaOH aktivierbaren Vorstufe nach Schmidt (Metathrombin s. u.).

3. Ist nicht abzusehen, inwiefern das aus dem Zymogen des Plasmas gebildete Ferment trotz seiner geringeren Menge wirksamer sein soll, als fremdes, hineingebrachtes Ferment.

Am leichtesten erledigt sich das sub 2 angeführte Bedenken — denn weder ist es sicher, daß das wirksam gewesene Ferment (gewissermaßen Metaferment) des Serums mit dem noch niemals aktivierten Proferment identisch ist, noch braucht eine so durchgehende Verwandtschaft zwischen der Wirkung des Alkalis und der zymoplastischen Substanz zu bestehen. Die Wirkung der Fluoride auf normales Blut allerdings kann nicht mit Sicherheit als eine Verhinderung der Zymogenese angesehen werden, denn Fluorplasma enthält keine nach Schmidts Vorschrift aktivierbare Substanz (womit nach dem Obigen noch kein Mangel an Proferment ausgesprochen zu sein braucht). Umgekehrt kann man die schließlich trotz allem nie ausbleibende späte Gerinnung des Fluorplasmas wohl nur auf Anwesenheit von Proferment beziehen. Dialysiert man Fluorplasma gegen kalkhaltige Kochsalzlösung, so tritt allerdings, anders als bei Oxalatplasma, keine Gerinnung ein*).

Die hier versuchte Unterscheidung der Profermente hat mit größerer Schärfe Morawitz[2]) durchgeführt, der unser Zymogen α-, unser Metaferment β-Prothrombin kennt.

Wenn nun weiter die Gerinnung des Plasmas ausschließlich dem eigenen Zymogengehalt desselben zur Last fällt, so müßte von einem gewissen Gehalt an zymoplastischer Substanz ab eine weitere Vermehrung derselben ohne Einfluß sein, wenigstens unter der Voraussetzung, daß die Wirkung des Ferments auf das Fibrinogen eine längere Zeitdauer beansprucht, als diejenige der zymoplastischen Substanz auf das Zymogen — eine Annahme, zu der man bei den bestehenden Mengenverhältnissen wohl genötigt ist. In der Tat konnten derartige Beobachtungen am Peptonplasma vom Hunde in denjenigen Fällen gemacht werden, wo genügend wirksame Lymphdrüsenextrakte zur Verfügung standen. Die Verdoppelung der Extraktmenge erwies sich in solchen Fällen unvermögend, die Gerinnungszeiten weiter zu verkürzen.

Ganz ähnlich verlief der Versuch auch, wenn Zymogen bzw. Ferment und Fibrinogen aus zwei verschiedenen Lösungen zusammengebracht wurden.

---

*) Es ist jedoch gelungen, solches Plasma durch kaum oder gar nicht fermenthaltige Extrakte (am besten gerade von Vögeln) zu koagulieren; die Angabe, daß (α)-Proferment dem Fluorplasma fehle, ist demnach cum grano salis zu verstehen.

Es dienten zu dem Versuch 0,5 ccm Fluorplasma vom Hund (0,4 Serum vom gleichen Hund) und Lymphdrüsenextrakt in 0,9 proz. Kochsalzlösung.

Für die verzeichneten Mengen Extrakt waren die Gerinnungszeiten:

ccm	
0,0	120"
0,3	16"
0,15	16".

Was nun den dritten Punkt anbetrifft, so scheint die Annahme erlaubt, daß das vorhandene Fibrinferment bzw. dessen Derivate die Gerinnung geradezu stören, und sich somit der Wirkung zugefügten Ferments in den Weg stellen. Man könnte sich dies etwa durch die Bildung eines Profermentoids vorstellen, entsprechend den Ausführungen Jacobys. Aber auch eine andere Reihe von Vermutungen kann nicht ausgeschlossen werden, welche die Beteiligung einer dritten Substanz bei der Blutgerinnung voraussetzen, sei es bei der Bildung des Fibrins als fibrinoplastische Substanz, oder, da diese Annahme durch Hammarsten wohl definitiv beseitigt ist, bei der Bildung des Fibrinogens aus seinen Komponenten nach Wooldridge, oder endlich und wahrscheinlich als Kinase (oder Komplement usw.) des Ferments oder Proferments. An diesem tertium quid wäre dann im Peptonblut Mangel.

Nur unter dieser Voraussetzung wäre man berechtigt, das normale Vogelblut mit dem Peptonblut des Säugetieres in eine Reihe zu stellen, da bei dem ersteren eine Abweichung von der Gesetzmäßigkeit gerade bei großen Extraktmengen nicht hervortritt.

Andererseits wird man diese Ähnlichsetzung wohl nicht abweisen können, nachdem wir nichts weiter getan haben, als die allseitig anerkannte Analogie zwischen Peptonblut von Hund und Gans mit größerer Schärfe für Peptongans und normale Gans nachzuweisen.

Der Unterschied des Peptonplasmas von dem rein aufgefangenen normalen Plasma läge danach für den Vogel nur in einer dem ersteren eigentümlichen Schutzwirkung gegen die Folgen weniger behutsamen Auffangens — ein Unterschied, welcher sich wegen seiner Geringfügigkeit der Analyse zunächst entzieht. Im dritten Kapitel wird auf diese Frage zurückgegriffen werden.

II. Blutegelplasma.

Während es uns für Peptonwirkung und Fluornatrium sehr leicht gelang, zu übereinstimmenden Versuchen zu kommen, und die Schwierigkeiten erst bei der Deutung begannen, liegen die Verhältnisse wesentlich verwickelter bei der Wirkung des Blut-

egelextraktes. Jedenfalls ist die Wirkung vorhanden und sehr deutlich, wie ja auch bei dem häufigen Saugen von Blutegeln an Schwimmvögeln zu erwarten ist.

5 Blutegelköpfe werden mit 20 ccm 0,9 proz. Kochsalzlösung verrieben. Die so erhaltene Stammlösung wird mit der gleichen Salzlösung aufs zehnfache verdünnt: Die vorgewärmten Lösungen werden vereinigt und während 1' bei 36° digeriert.

Muskelextrakt ccm	Kochsalzlösung ccm	Blutegelextrakt ccm	Gänseplasma ccm	Gerinnt nach
0,2	0,4	0,0	1	64"
0,2	0,4	0,1	1	104"
0,2	0,4	0,1	2	120"
0,1	0,4	0,0	1	98"
Digestionsdauer 4':				
0,2 ccm	0,3 ccm	0,1 ccm	1 ccm	91"
0,2 „	0,3 „	0,1 „	2 „	122"
0,1 „	0,35 „	0,05 „	2 „	140"

Aus diesen Versuchen geht zunächst wiederum hervor, daß der Einfluß der Verdünnung auf den Eintritt der Gerinnung ganz unerheblich ist. Außerdem fällt die große Differenz zwischen zwei Doppelversuchen auf, gegenüber der guten Übereinstimmung der andern. Trotzdem scheint es ganz sicher, daß die Wirkung der Extrakte aufeinander nicht proportional verläuft, sondern daß die Menge des Plasmas in Rechnung zu ziehen ist, indem eine Vermehrung desselben die hemmende Wirkung des Blutegelextraktes erhöht.

Ferner ist, wie zahlreiche Versuche zeigten, die Dauer der Digestion der Muskelextrakte mit dem Egelextrakt für die Dauer von 0 bis 10' ohne jeden Einfluß, oder der Einfluß liegt innerhalb der Versuchsfehler und seine Richtung wechselt.

Hingegen nimmt die Wirkung des Hirudins durch Digestion mit dem Plasma zu.

Plasma	Hirudin	Digestion	Muskelextrakt	Gerinnungszeit
0,9	0,09	0'	0,18	150"
—	—	1'	—	175"
—	—	10'	—	176"
—	—	>15'	—	188"
0,5	0,05	0'	0,1	146"

Die erste und die letzte Probe wurde so angestellt, daß die bezeichneten Plasmamengen in das Gemenge von Extrakt und Hirudin einge-

blasen wurden. Die drei anderen Proben wurden mit einem Gemisch von 4,5 ccm Plasma und 0,45 Hirudin ausgeführt.

Es scheint hiernach zunächst, als ob es das Plasma oder ein Reaktionsprodukt zwischen ihm und dem Extrakt sei, auf das das Hirudin einwirkt.

Läßt man das Verhältnis zwischen Plasma und Ferment konstant, so wächst die Gerinnungsdauer mit der Hirudinmenge.

Wasserbad 38°, Digestionsdauer 5'.

Hühner-muskelextrakt	NaCl-Lsg. ad 0,6	Blutegel-extrakt	Gänseplasma	Gerinnungs-zeit	berechnet
0,2	—	0	1	46"	—
0,2	—	0,1	1	75"	76"
0,2	—	0,15	1	112"	108"
0,2	—	0,05	1	58"	55"

Hiernach würden je 0,05 ccm Hirudin unter diesen Verhältnissen etwa die Wirkung des gleichen Volums Extrakt aufheben. Berechnet man die Fermentmenge x aus der beobachteten Gerinnungszeit y und den zugehörigen Normalwerten x_0 und y_0 nach der Formel $\log x = \log x_0 + 1{,}710 (\log y_0 - \log y)$, so findet man der Reihe nach die Werte

wirksam	demnach unwirksam geworden	pro 0,05 Hirudin	Differenz*) pro 0,5 Hirudin
0,2	0,0	—	—
0,087	0,113	0,056	0,48
0,044	0,156	0,052	0,43
0,135	0,065	0,065	0,65

Die unter Zugrundelegung des „Mittelwertes" berechneten Gerinnungszeiten stimmen mit der Beobachtung recht gut überein; immerhin ist nicht zu verkennen, daß die extremen Werte sich in entgegengesetztem Sinne vom Verlangten entfernen. Auch stehen die erschlossenen Fermentmengen sehr nahe in dem Verhältnis 1 : 2 : 3.

Variiert man dagegen die Fermentmenge bei gleichbleibender Plasma- und Hirudinmenge sowie Verdünnung, so ändert sich das Bild.

---

*) Hierunter ist verstanden der Unterschied von dem in der Reihe benachbarten Wert.

Wasserbad 36°, Gänseplasma 1,0, Gesamtvolum 1,6 ccm durch 0,9 proz. NaCl-Lösung aufgefüllt.

Extrakt	Hirudin	Zeit	Ferment	
			wirksam	unwirksam gemacht
0,2	0,0	62"	0,2	0,0
0,1	0,1	230"	0,027	0,073
0,2	0,1	92"	0,102	0,098
0,25	0,1	85"	0,116	0,134
0,4	0,1	50"	0,248	0,152

Die gleiche Menge Hirudin übt also gegenüber einer großen Fermentmenge eine weit bedeutendere Wirkung aus, als gegenüber einer kleinen. Daß dies Verhalten nicht auf die Gegenwart von Fermentoiden zurückzuführen ist, lehrt der erste Versuch und die ihm analog angestellten. Die Unterschiede liegen weit außerhalb der Versuchsfehler; sie sind so bedeutend, daß nach Maßgabe der folgenden berechnet die erste Probe überhaupt während einer kontrollierbaren Zeit nicht hätte gerinnen dürfen.

Wir werden zu der Annahme veranlaßt, daß Hirudin und Extrakt in entgegengesetztem Sinne auf das Plasma wirken.

0,3 Muskelextrakt, 1,0 Plasma, Kochsalz ad 1,6

Hirudin	Zeit	Ferment		pro 1 Hirudin	Differenz
		wirksam	unwirksam gemacht		
0,0	91"	0,3	0	—	—
0,0	90"				
0,1	115"	0,207	0,093	0,93	0,93
0,2	150"	0,129	0,171	0,85	0,78
0,3	194"	0,084	0,216	0,72	0,45

Die Abweichungen sind in diesem Versuch kleiner als im vorigen, aber viel bedeutender als im ersten; die Wirkung des dritten Zehntel Kubikzentimeters ist nur halb so groß als die des ersten.

Daran anschließend wurde ein Versuch mit Vielfachen des „Fermentüberschusses" (Rödén) bei dem Mischungsverhältnis Hirudin 1 : Extrakt 3 angestellt. Die Auffüllung mit Kochsalzlösung ging der Eintragung des Plasmas um 100" voraus.

Mischung ccm	Zeit	Ferment		pro 1 ccm Hirudin
		wirksam	zerstört	
0,2	239"	0,06	0,09	1,8
0,4	130"(?)	0,17	0,13	1,3
0,6	111"	0,22	0,23	1,5
0,8	112"	0,22	0,38	1,9

Die Zahlen stimmen wiederum mit der Berechnung nicht allzugut überein; leider reichte der Vorrat an Mischung nicht zur Wiederholung. Jedenfalls ist es auffällig, daß die Werte mit größeren Dosen sehr nahe aneinander liegen; nimmt man den Wert für den zweiten Versuch aus der vorigen Tabelle zu 115", so springt dies noch mehr in die Augen. Sicherlich handelt es sich nicht um eine so einfache Beziehung, daß bei einer bestimmten Mischung ein aliquoter Teil des Ferments frei, ein anderer neutralisiert wäre.

In der gleichen Weise wurde eine Versuchsreihe mit einem hirudinhaltigen Plasma (10proz.) gemacht.

Sie nahm folgenden Verlauf.

ccm	Zeit	Ferment	unwirksam geworden
0,1	269" (ca.)	0,043	0,057
0,2	144"	0,132	0,068
0,4	109"	0,204	0,20
0,6	74"	0,396	0,20

Auch hier wird die Wirkung des Extrakts um so mehr gestört, je mehr da ist, doch nähert sich die Menge, wie es scheint, einem Grenzwert.

Endlich wurde noch ein Versuch mit Variation der Extraktmenge angestellt, und außerdem zu jeder Extraktmenge die einfache und doppelte Menge einer Hirudinlösung gefügt. Auch dieser Versuch gab kein einfaches Resultat.

Wasserbad 37,5°

	Ferm. ccm	Hirudin ccm	Plasma ccm	Na Cl ccm	Zeit	Wirksam	Unwirksam gemacht	Diff.
0	0,1	0,0	0,5	0,2	61"	0,1	—	
	0,08	0,0	0,4	0,16	63"	0,08	—	
1	0,1	0,05	0,5	0,15	83"	0,607	0,39	0,39
	0,1	0,10	0,5	0,10	100"	0,442	0,56	0,27
2	0,2	0,05	0,5	0,05	49"	0,150	0,05	0,5
	0,2	0,10	0,5	0,00	59"	0,109	0,089	0,39
3	0,3	0,1	0,5	0,00	45"	0,173	0,130	

Hieraus geht hervor, daß die Wirkung einer gegebenen Hirudinmenge wächst mit der Menge des Muskelextrakts und abnimmt, wenn mehr Hirudin hinzugefügt wird.

Alle diese Versuche wurden angestellt an den mit Pepton injizierten Tieren; sie wurden wiederholt an einer normalen Gans.

Die Temperatur des Wasserbads war 32°; zur schärferen Bestimmung des Gerinnungsanfangs diente Paraffinstaub. Gänsemuskelextrakt und

Blutegelinfus (5 ccm pro Kopf) wurden während einer Minute in der Wärme digeriert und 1 ccm Plasma hinzugegeben. Die zehnfache Verdünnung des Infuses wurde als Einheit genommen — die größeren Dosen wurden als je 0,2 einer entsprechend konzentrierten Lösung eingeführt.

Extrakt ccm	Hirudin ccm	Zeit	Wirksam*)	Unwirksam*) geworden	Differenz*)
0,4	0,0	45'' 44''	4	0	—
0,2	0,0	68''	2	0	—
0,4	0,2	55'' 53''	3	1,0	—
0,4	0,4	58'' 56''	2,67	1,33	0,33
0,4	0,8	82'' 82''	1,43	2,57	1,24
0,4	1,6	157'' 168''	0,47 0,42	3,53 3,58	0,98

Die 1ten 0,2 Hirudin machen also unwirksam 1,0 Extrakt
„ 2. 0,2 „ „ „ „ 0,33 „
„ 3. } „ 4. } 0,2 „ in Mittel 0,62 Extrakt
„ 5. } „ 6. } „ 7. } „ 8. } 0,2 „ in Mittel 0,25 Extrakt

Extrakt ccm	Hirudin ccm	Zeit	Wirksam*)	Unwirksam*)	Differenz*)
0,4	0,0	67'' 68''	4	0	
—	0,2	79'' 81''	3,02	0,98	0,98
—	0,4	125'' 129''	1,36	2,64	1,66
0,2	0,2	151'' 153''	1,0	1,0	1,00
0,2	0,0	77''	2	0	
0,4	0,0	52''	4	0	
0,4	0,1 0,1	57'' 57''	3,29	0,71	
0,3	0,1 0,1	66'' 64 1/2''	2,69	0,31	
0,2	0,1	<83'' 85''	1,70	0,30	
0,1	0,1	136''	0,77	0,23	

*) Die hierunter stehenden Werte sind für ein zehnmal schwächeres Extrakt berechnet.

Extrakt ccm	Hirudin ccm	Zeit	Wirksam*)	Unwirksam*)	Differenz*)
0,2	0,0	35″	2	0	
0,4	0,0	24″	4	0	
0,4	0,4	55″ 57″	0,94	3,06	
0,2	0,4	113″ 110″	0,29	1,71	
0,3	0,4	80″ 78″	0,50	2,50	
Extrakt und Hirudin zu gleichen Teilen		Zeit	Zeit ber.		
0,6		68″ 70″	69″		
0,3		75″ 75″	103,5″		
0,1		132″ 137″	197″		

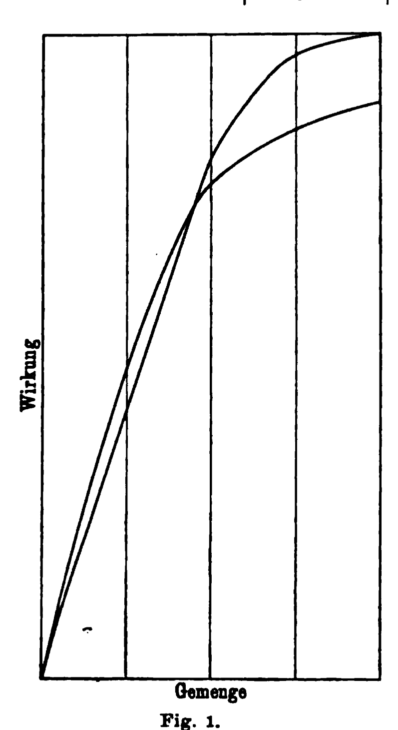


Fig. 1.

Aus allen diesen Versuchen, so verschiedenartig sie angestellt und so wenig gleichmäßig sie ausgefallen sind, geht hervor, daß die Vorgänge bei der Hirudinwirkung kompliziert sind und zwar daß, wie besonders der letzte Versuch zeigt, ein gegebener Prozentgehalt an Hirudin stärker wirkt, wenn viel Plasma + Extrakt da ist, als wenn die betr. Menge gering ist. Aber die Abweichung ist um so stärker, je größer die Extraktmenge ist. Mit anderen Worten, die Kurve nähert sich ziemlich rasch einem Grenzwert. Da sie sich der an der Peptongans erhaltenen wesentlich gleich verhält, so seien beide hier wiedergegeben. (Fig. 1 u. 2.)

*) Die hierunter stehenden Werte sind für ein zehnmal schwächeres Extrakt berechnet.

Die Übereinstimmung ist bei geeigneter Wahl der Koordinatenwerte überraschend gut, wenn man erwägt, daß mindestens drei Substanzen beteiligt sind und eine nicht ganz einfache Berechnung zu erfolgen hatte. Ja, man wird in der charakteristischen Ähnlichkeit nur die Folge eines günstigen Zufalles erblicken dürfen, da ja die Stärke der Extrakte und ihr Verhältnis verschieden war.

Aus eben diesem Grunde aber sind diese Kurven um so wertvoller.

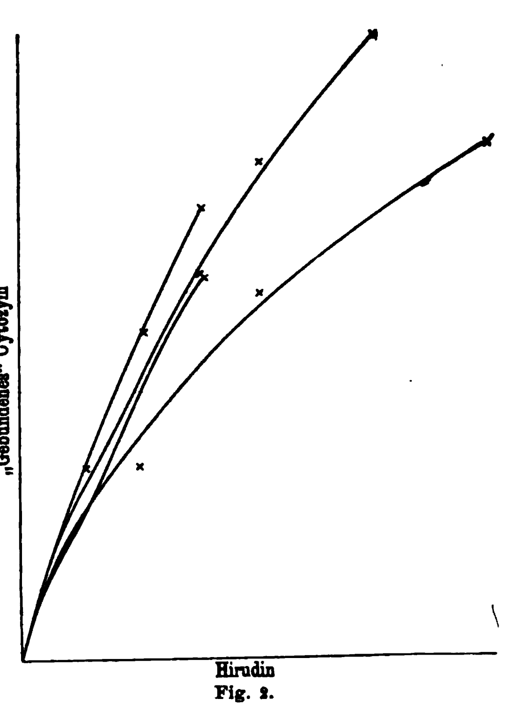


Fig. 2.

Es zeigt sich in ihnen ausgedrückt, daß ein hirudinhaltiges Muskelextrakt sich von dem normalen vor allem darin unterscheidet, daß es den Eintritt des als Gerinnungsmoment charakterisierten Zustandes nicht „beliebig" zu beschleunigen imstande ist. Vielmehr scheint jedem Plasma und Mischungsverhältnis eine bestimmte Minimalzeit zugeordnet zu sein, welche durch Vervielfachung des „Fermentüberschusses" sich nicht weiter herabsetzen läßt. Nehmen wir als wahrscheinlich hinzu, daß Hirudin und ein Plasmabestandteil zusammen reagieren, so lassen die Verhältnisse sich so aussprechen, daß eine Verteilung dieses Plasmabestandteiles an Hirudin und Extrakt stattzufinden scheint.

Jedoch ist selbst bei dieser nicht absolut bewiesenen Voraussetzung die Summe der Auffassungsmöglichkeiten zu groß, um im einzelnen erörtert zu werden.

Wenn es jedoch gestattet ist, unsere Meinung kurz auszusprechen, so sei gesagt, daß wegen der nie ausbleibenden späten Gerinnung, selbst bei hohen Hirudindosen, eine Substanz, welche das Fibrinogen in einem der Koagulation hinderlichen Sinn beeinflussen würde, unwahrscheinlich — dagegen die Anwesenheit

eines Proferments usw. im Vogelblutplasma selbst aus mehreren Gründen wahrscheinlich ist. Letzteres sei Plasmozym genannt.

1. Das Plasma reagiert mit dem Hirudin.

2. Schmidts echtes Fibrinferment oder frisches Serum (an Fluorplasma geprüft) ebenso. Haycraft u. a. haben nachgewiesen, daß Schmidtsches Ferment eine unwirksame Hirudinverbindung bildet.

3. Die Abwesenheit eines dem letzteren analogen Enzyms wurde im Muskelextrakt durch Fluornatrium erwiesen*).

Sobald nun mit der Hirudin-Extraktmischung ein ausreichender Vorrat an Cytozym, wie wir den wirksamen Bestandteil des Organextrakts nennen wollen, in das Plasma gebracht ist, so verläuft die Gerinnung nicht mehr, wie sonst im Vogelblut und im Peptonblut nach Maßgabe des Cytozymgehalts, sondern nunmehr nach der Höhe des Plasmozymgehalts. Letzterer aber regelt sich nach dem Verhältnis Cytozym : Hirudin, welches konstant ist.

Hierdurch werden wir zu einer präziseren Hypothese über die Natur des Cytozyms genötigt: es erscheint als ein mit dem Plasmozym („Proferment“) reagierender Körper, etwa als Komplement oder Kinase**).

Daß nicht das Fibrinogen mit dem Hirudin in Reaktion tritt, wird übrigens durch folgende Erwägung plausibel. Ein Plasma koaguliert in dem Augenblick, wo ein bestimmtes Verhältnis von Fibrin zu Fibrinogen erreicht ist, in weitem Umfang unabhängig von der Verdünnung. Nimmt man nun einen Teil des Fibrinogens weg, zumal indem man ihn etwa in wahre Lösung bringt, so müßte eine verdünntere, d. h. rascher koagulierende Fibrinogenlösung entstanden sein.

Schließlich hat der eine von uns zu Anfang seiner Versuche mit Geflügelplasma die ihm damals unerklärliche Beobachtung gemacht, daß Proben, welche bei der damals angewendeten höheren Wasserbadtemperatur (40°) über Nacht gestanden hatten, sich als nicht gerinnbar durch Muskelextrakt erwiesen.

Diese Beobachtung erklärt sich durch das Zugrundegehen des „Profermentes“ oder wie wir dasselbe nun richtiger nennen wollen Plasmozyms.

*) Auch läßt dasselbe, einmal unwirksam geworden, keine Aktivierung durch Alkali zu.

**) Man kann natürlich auch die Sache umdrehen und die Kinase ins Blut verlegen — um solcher Willkür aus dem Wege zu gehen, führen wir eine gleichmäßige Bezeichnung durch.

Hat hiernach die Umrechnung der Gerinnungszeiten auf Enzymmengen (worunter das nach der Formel ($x = y^K$) wirkende Cytozym verstanden war) zu Resultaten geführt, welche eine Änderung der Betrachtungsweise erfordern, so ist es nicht weiter verwunderlich, daß die unter den scheinbar einfacheren Bedingungen angestellten Versuche mit Variation nur eines Faktors, sei es der Cytozym-, sei es der Hirudinmenge, zu keinem übersichtlichen Resultate führten. Rechnet man, wie es oben geschehen, die Verzögerung des Gerinnungseintritts auf zerstörte Cytozymmengen um, so erhält man, wie zu erwarten, bei Veränderung des Hirudingehalts eine relativ einfache Kurve, welche von der geraden Linie sich nicht sehr weit entfernt, indem sie etwas weniger rasch ansteigt.

In der Tat nehmen wir ja an, daß jede Einheit Hirudin etwas von den die Gerinnung ermöglichenden Faktoren in Beschlag nimmt. Da wir nun aber weder das Wirkungsgesetz des Schmidtschen Fermentes, noch die Dissoziationskonstante seiner Hirudinverbindung, noch die Konstitution beider im Ehrlichschen Sinne kennen oder für diesmal aufzuklären vermögen, so hat eine Erörterung der Kurve zu unterbleiben, da für die aus ihr abzuleitenden Hypothesen die Prüfung nicht ausführbar ist.

Noch viel schwieriger aber ist die Deutung der Kurven mit wechselnder Extraktmenge oder (wie der Versuch auch angestellt wurde) die Gerinnung hirudinhaltigen Plasmas mit Extrakt.

Im großen und ganzen geht die Kurve des (scheinbar) wirksamen Cytozyms mit derjenigen des durch wachsende Hirudinmengen (scheinbar) zerstörten parallel. Jedoch kommen kleine Unregelmäßigkeiten vor und ist ihre Übersichtlichkeit zu gering.

Auch die Gerinnung des Fluorplasmas durch wirksames Ferment wird vom Hirudin etwa proportional seinem Gehalt verhindert.

Wie zu erwarten, kann diese Verzögerung durch Vermehrung des Cytozyms (Lymphdrüsenextrakt) verhindert werden.

Ebenso ist ein und dieselbe Hirudinfermentmischung in scheinbar paradoxer Weise unwirksam für eine kleine, gerinnungserregend für eine größere Plasmamenge.

Fassen wir unsere Ergebnisse kurz zusammen, so haben wir gefunden, daß Peptonplasma vom Vogel sich genau so verhält wie rein aufgefangenes Vogelplasma. Beiden untereinander und mit dem gewöhnlichen Peptonplasma gemeinsam ist der Mangel eines integrierenden Faktors der Gerinnung, welchen wir Cytozym nennen und als Komplement (Kinase) auffassen. Vermutlich ist es dieses, was früher oft unter den Namen Proferment, Ferment, Gewebsfibrinogen, fibrino- sowie zymoplastischer Substanz usw. verstanden wurde. Unter gewissen Bedingungen beim Peptonblut und Vogelplasma imponiert es als Ferment und im letzteren Falle

konnte sein Wirkungsgesetz für konstanten Fermentgehalt ermittelt werden. Vermutlich kommt ihm eine weitgehende Spezifizität zu.

Vollkommen anders als plasmozymhaltiges, cytozymfreies („Pepton"-)Blut verhält sich das mit einer fermentbindenden Substanz versehene Hirudinblut. Zwischen Hirudin und Cytozym findet eine Verteilung des Plasmozyms statt, die bei konstantem Gehalt an letzterem und wechselnder Mengen einer gegebenen Hirudin-Cytozymmischung zu einer konstanten Gerinnungszeit führt.

Alle im Vorstehenden angeführten Versuche wurden an Geflügel angestellt, das in Straßburg gekauft war.

Nach Fertigstellung des Manuskriptes jedoch wurden Versuche mit Tieren aus der Umgebung Halles vorgenommen, Versuche, die aus irgend einem nicht weiter verfolgten Grunde zum Teil zu weit durchsichtigeren Resultaten führten. Wegen ihrer Übersichtlichkeit und der Verringerung der Fehlerquellen wurde die Methode des „Fermentüberschusses" angewendet, d. h. es wurden Gemenge von Hirudin und Cytozym verwendet — nun ergab es sich, daß hierbei die Kurve der Wirksamkeit ein ausgesprochenes Maximum durchlief, demnach ein Aussehen annahm wie die aufgezeichneten Kurven, wenn man sie durch ihr Spiegelbild verlängern und so der Abszisse nähern wollte. Bei dieser Gelegenheit sei daran erinnert, daß in einem bereits verzeichneten Falle wirklich bei einer höheren Dosis des Gemenges es um eine Kleinigkeit länger dauerte, bis Gerinnung konstatiert wurde, was als Versuchsfehler aufgefaßt wurde.

Gänsepeptonplasma, Gänseschlundextrakt, Blutegelinfus 5 ccm auf 1 Kopf. Wasserbad 37°.

Extrakt 0,2 Plasma 1,0 Infus 0,0 60"

3 Extrakte + 0,1 Infus 5' in der Wärme gehalten, dann gekühlt in Eiswasser.

Gemenge	Plasma	
0,2	1,0	163"
0,4	—	122"
0,8	—	110"
0,4	—	125"

Truthahnplasma.

Extrakt	Plasma	
0,1	1,0	63"
Extrakt 2, Infus 0,1 — Gemenge		
0,2	—	102"
0,4	—	116"
0,8	—	157"

Gänsepeptonplasma, Hühnerextrakt.
Extrakt 2, Infus 0,2, 5' — dann Eiswasser.

Gemenge	
0,2	85"
0,8	über 300"
0,1	92"
0,4	147"
(Extrakt 0,2 Infus 0,0	35")

Hier liegt also das Maximum der Wirkung zwischen 0,1 und 0,2!

Extrakt 2, Infus 0,1 wie oben.

0,2	38"
0,4	42"
0,8	68"

Nach diesen neuen Versuchen ist es ohne Diskussion klar, daß ein Neutralisationsvorgang zwischen Cytozym und Hirudin nicht stattfindet, wonach also das Plasmozym oder das Holozym (wie wir das wirksame Ferment nennen) mit ihm reagiert; die hieraus sich ergebende Folgerung, daß im Geflügelplasma ein wesentlicher Gerinnungsfaktor bereits enthalten ist, wird der eine von uns durch andere Versuche weiter erläutern. Wir wären mit unseren Darlegungen zu Ende, wenn nicht die Resultate am Peptonplasma allzu unbefriedigend wären, so daß eine Aufklärung der Widersprüche zwischen unsern und den früheren Angaben auf alle Weise versucht werden mußte.

III. Der gerinnungshemmende Stoff des Peptonplasmas.

Es bestand die Absicht, eine Anzahl von Hühnerplasmen, darunter eins von einem Peptonhuhn zu bereiten und mit dem gleichen Extrakt die Gerinnbarkeit aller zu vergleichen. Der Versuch*) scheiterte an der spontanen Gerinnung des Peptonplasmas kurz nach der Entnahme.

Nicht viel ermutigender gestaltete sich ein Versuch*) an der Gans.

Nach Entnahme von etwa 60 ccm Blut wurde die berechnete Peptonmenge injiziert. Das auf der Höhe der Wirkung entnommene Blut gerann teilweise spontan, wofür das Liegenbleiben der Kanüle verantwortlich zu machen ist. Immerhin blieben zwei Gläser zunächst ungeronnen und konnten nach Entfernung der sich bald einstellenden zarten Flocken mit der normalen Portion verglichen werden.

Bei allen diesen Versuchen, welche übrigens der Bequemlichkeit halber in der Kälte angestellt wurden, zeigte es sich, daß die Gerinnung in der völlig unveränderten normalen Portion bei gleicher Behandlung früher eintrat, als in den peptonisierten.

*) Die Berechnung der Peptonmenge, Konzentration der Lösung, Vorbereitung und Verhalten der Tiere genau wie in Teil I.

Für die beiderseitigen Blutkörperchen dagegen konnte nach Auflösung gleicher Mengen in Wasser und Verbringung auf 0,9 Proz. Kochsalzgehalt absolut kein Unterschied der Wirksamkeit konstatiert werden.

Peptonplasma 0,5,	Muskelextrakt 0,1	a) 8′
		b) 8′
Normalplasma 0,5,	Muskelextrakt 0,1	a) 8′
		b) 9′

Blutkörperchen behandelt in Wasser, aufs dreifache verdünnt

1. normale 0,5	Plasma . . . 0,5	a) 40′
	normal . . .	b) 64′
	Peptonplasma 0,5	a) 60′
		b) 80′
2. vom Peptonblut 0,5	Plasma . . . 0,5	a) 42′
	normal . . .	b) 64′
	Peptonplasma 0,5	a) 80′
		b) 80′
Muskelextrakt $^1/_{100}$	Normal . . . 0,5	a) 53′
		b) 88′
	Pepton . . . 0,5	a) 106′
		b) 136′
Taubenserum a) 0,5	Normal . . . 0,5	a) 66′
b) 0,25		b) 87′
a) 0,5	Pepton . . .	a) 102′
b) 0,25		b) 132′

Es scheint somit, als ob in der Tat die Einverleibung von Pepton beim Vogel eine Veränderung der Blutgerinnbarkeit bewirkt, die sich aber dem Nachweis durch stark wirksames Organextrakt entzieht*).

Um die Möglichkeit eines solchen Vorkommnisses zu beweisen, wurde Peptonplasma vom Hund verwendet. Nach Erwärmung auf 60° und Filtration vom ausgeschiedenen Fibrinogen resultierte ein verwendbares Peptonserum. Fügte man von diesem eine bestimmte Menge zu Geflügelplasma, so ergab sich eine Flüssigkeit von einer gegenüber dem Organextrakt stark verminderten Gerinnbarkeit, jedoch völlig intaktem Zeitgesetz**).

Peptonplasma vom Hund auf 60° erwärmt, Hühnerplasma und -Extrakt:

0,2 Extrakt	1 Plasma	36″
0,2 Extrakt + 0,1 Peptonserum	1 Plasma	54″
0,4 „ + 0,2 „		56″
0,6 „ + 0,3 „		54″

*) Bedeutend ist diese Wirkung jedenfalls in den von uns beobachteten, nach allen Vorschriften behandelten Fällen keineswegs gewesen.

**) Ganz ähnlich verhält sich übrigens auch frisches Ochsenserum, trotz seiner (geringen) koagulierenden Wirksamkeit, wie später mitzuteilen sein wird.

Truthahnplasma:

0,2 Extrakt	. . . .	68″	berechnet
0,2 Extrakt + 0,2 Peptonserum	. . . .	94″	96″
0,4 „ + 0,2 „	. . . .	66″	65″
0,8 „ + 0,2 „	. . . .	43″	43″
0,4 Extrakt + 0,1 Peptonserum	. . . .	46″	
0,4 „ + 0,4 „	. . . .	144″	
0,4 „ + 0,2 „	. . . .	66″	

Eine Mischung von Cytozym und Peptonserum ergibt eine Annäherung an die gezeichneten Kurven für Hirudin, entsprechend der Délezenneschen Auffassung, wonach beide gerinnungshemmenden Agentien analog, wonicht identisch sein sollen.

Wir haben nun zu entscheiden, auf welchen Gerinnungsfaktor sie einwirken. Bei dem Fermentabsorptionsvermögen beider Plasmen unterliegt es keinem Zweifel, daß sie unser Holozym zu binden vermögen; ob sie auch Plasmozym binden können, ist nicht ganz sicher; unsere Versuche sprechen dafür, ebenso die Beobachtung Alexander Schmidts, daß alle Gerinnungshindernisse gegen spontan gerinnende Flüssigkeiten energischer wirken, als gegen Ferment, obwohl hier daran zu denken ist, daß die Wahrscheinlichkeit für die Fermentmoleküle, vor ihrer Bindung auf das Fibrinogen zu wirken, in letzterem Falle wohl größer ist.

Auch wir haben hierüber Versuche mit ganz ähnlichem Resultat angestellt.

Das Serum eines bestimmten Quantums Kaninchenblut (nach der spontanen Gerinnung mit den Händen ausgepreßt) brachte rasch eine Menge Peptonplasma zur Gerinnung, welches genügte, das genannte Volum Kaninchenblut noch längere Zeit über die Versuchsdauer hinaus flüssig zu erhalten. Die ungezwungenste Erklärung für diesen Versuch liegt in der Annahme einer Bindung des Plasmozyms an das Peptonplasma (oder das Hirudin).

Fragt man nun, ob ein ähnlicher Antikörper nicht auch bei dem Zustandekommen des Zeitgesetzes beteiligt ist, so muß die Antwort dahin lauten, daß dies keineswegs unmöglich.

Der Nachweis eines solchen Antikörpers im Vogelplasma ist dem einen von uns gelungen, sowohl für seine eigene Gerinnung wie für diejenige anderer Testflüssigkeiten.

Andererseits besteht so lange kein Zwang zu dieser Annahme, als man mit einer Verminderung (resp. Verteilung) des Plasmo- oder Holozyms auskommt.

Ob allerdings das Zeitgesetz den Aktivierungsvorgang eines etwa nach direkter Proportionalität wirksamen Ferments aus-

drückt, oder die Wirkungsweise dieses selbst, muß dahingestellt bleiben.

Bei seinem ausgeprägt empirischen Charakter schadet das ja auch nichts; jedenfalls stellt es einen katalytischen Vorgang mit gut brauchbarer Annäherung dar; die Zwischenstufen desselben wird (wie stets) erst eine fortgesetzte Analyse zu liefern imstande sein. Einen weiteren notwendigen Faktor haben wir im Plasmozym bereits kennen gelernt. Seinen direkten Nachweis soll der eine von uns alsbald erbringen und auch sein Verhältnis zu der Kalziumwirkung betrachten.

Literaturverzeichnis.

1) E. Fuld, Diese Beiträge 2, 514.
2) Morawitz, Das. 4, 381.
3) Délezenne, Arch. de physiol. 9, 333.
4) Spiro und Ellinger, Zeitschr. f. physiol. Chemie 23, 121.
5) Spangaro, Atti del Reale Instit. Veneto S. 843.
6) Wooldridge, Die Gerinnung des Blutes. Deutsch von Frey. Leipzig 1891.
7) Arthus, Journ. de physiol. et pathol. générale 1901, S. 887.
8) Helge Rödén, Upsala läkare förenings Fôrhandlingen 23, 546.
9) Eguet, Über den Einfluß des Blutegelinfuses auf die Thrombinbildung. Diss. Bern 1894.
10) Dickinson, Journ. of Physiol. 11, 566.
11) Délezenne, Trav. du lab. de physiol. de Montpellier 1898, S. 213f. (cit. nach Arthus, coagulation du sang.)

XII.

Über die Koagulation des Blutes einiger Arthropoden*).

Von **Leo Loeb.**

Aus dem Marine Biological Laboratory, Woods Holl, Mass. und dem pathologischen Laboratorium der University of Pennsylvania, Philadelphia.

I.

Über die Beziehungen zwischen erster und zweiter Koagulation des Arthropodenblutes.

In einer früheren Arbeit**) berichtete ich über Versuche betreffend die Blutgerinnung einiger Arthropoden. Es ergab sich unter anderem, daß die Bedingungen, unter denen die Gerinnung des Blutes von Limulus und die erste Gerinnung des Blutes des Hummers und einiger Krebse verhindert werden kann, verschieden sind von den Bedingungen, unter denen die sogenannte zweite Gerinnung des Blutes des Hummers und einiger Krebse unterbleibt. Die Gerinnung des Limulusblutes wird nur dann verhindert, wenn das Blut in einem starken Überschuß gesättigter Kochsalz-, Magnesiumsulfatlösung und einiger anderer Salzlösungen oder in gesättigter Oxalatlösung aufgefangen wird, während die zweite Gerinnung des Hummerblutes schon durch Zusatz einer geringen Menge einer 2proz. Oxalatlösung aufgehoben wird. Ebenso ließ sich die erste Gerinnung durch vorheriges Erwärmen des Tieres, durch Auffangen des Blutes in Leberpankreassaft von Arthropoden oder in Gelatinlösungen aufheben oder einschränken. Mikroskopisch stellt sich die Gerinnung des Limulusblutes und die erste

---

*) Diese Versuche wurden an einem von der Carnegie Institution zur Verfügung gestellten Arbeitstisch und mit Unterstützung aus dem Research Fellowship Fund der Mc Gill University, Montreal, ausgeführt.

) Über die Bedeutung der Blutkörperchen für die Blutgerinnung und die Entzündung usw. Virchows Archiv **173, 1903. (Diese Versuche waren im Sommer **1901** und **1902** ausgeführt worden. In, wie es scheint, etwa zu gleicher Zeit ausgeführten Versuchen kamen B o t t a z z i und D u c c e s c h i, soweit dieselben Probleme behandelt wurden, zu ähnlichen Ergebnissen, wie die in meiner früheren Arbeit mitgeteilten.)

Gerinnung des Blutes anderer Arthropoden als eine Agglutination der Blutzellen und des aus den Zellen ausgetretenen Protoplasmas dar. Das Ausstrecken der Pseudopodien ist ein für die Bildung des Gerinnsels nebensächlicher Vorgang.

In meiner früheren Arbeit wurde die Möglichkeit offen gelassen, daß bei der Gerinnung des Limulusblutes und bei der ersten Gerinnung anderen Arthropodenblutes außer der Agglutination des Zellprotoplasmas auch noch die Gerinnung eines vorher in Lösung befindlichen Fibrinogens stattfindet. Eine solche Gerinnung wird auch von vielen Autoren als wahrscheinlich angenommen*). Nach dieser Auffassung wäre dann die erste Gerinnung nicht wesentlich verschieden von der zweiten. Die im folgenden mitzuteilenden Tatsachen machen es jedoch zum mindesten sehr wahrscheinlich, daß die Blutgerinnung bei Limulus und die erste Gerinnung bei anderen Arthropoden eine reine Agglutinationserscheinung von Zellen oder von aus Zellen ausgeflossenem Protoplasma darstellen.

1. Die Bedingungen für die Aufhebung der Gerinnung des Limulusblutes und der ersten Gerinnung der anderen Arthropoden sind verschieden von den Bedingungen, unter denen die zweite Gerinnung aufgehoben wird. Die letzteren sind in bezug auf die Wirkung der Kalzium fällenden Substanzen ähnliche wie bei Wirbeltieren. Zur Aufhebung der Gerinnung des Limulusblutes und der ersten Gerinnung der anderen Arthropoden sind viel stärkere Lösungen der gewöhnlich zu solchem Zwecke benutzten Salzlösungen und der Oxalate erforderlich. Fangen wir Limulusblut in einem Überschuß einer 2proz. Kaliumoxalatlösung auf, so wird die Gerinnung nicht verhindert. Wenn wir Hummerblut oder das Blut eines Krebses in etwa der Hälfte des Blutvolums einer 2proz. Oxalatlösung auffangen, so findet die erste Gerinnung wie gewöhnlich statt, die zweite Gerinnung wird aber aufgehoben. Die Gerinnung des Limulusblutes entspricht also der ersten Gerinnung der anderen Tiere.

Die Mittel, welche die Gerinnung des Limulusblutes aufheben, haben alle einen stark zellerhaltenden Einfluß. Sie hemmen das Ausströmen des Protoplasmas aus den Zellen. Sie vermindern die Agglutination der Blutzellen oder heben dieselbe auf.

2. Wenn wir Limulusblut in einem Überschuß von Gelatinelösung auffangen, so kann die Gerinnung zu einem großen Teil vermieden werden. Untersuchen wir eine solche Blutgelatinelösung vorsichtig unter dem Mikroskop, so finden wir die Zellen

*) Literaturangaben finden sich in meiner früheren Arbeit und bei v. Fürth. Vgl. Physiolog. Chemie der wirbellosen Tiere. Jena 1903.



gequollen, teilweise frei in der Flüssigkeit liegend, teilweise kleine epithelartige Haufen bildend. Verwenden wir dünne Gelatinelösungen, so verursacht stärkere Bewegung noch nachträglich eine Agglutination der Blutzellen, welche makroskopisch in einer Bildung von Fäden zum Ausdruck kommt. Auch wenn wir Limulusblut in destilliertem Wasser auffangen, quellen die Zellen ähnlich und bleiben zum Teil frei, zu einem großen Teil aber kleben sie in Reihen oder Flächen epithelartig aneinander.

Ein Ausfließen des Protoplasmas wird in diesen Lösungen bei sehr vielen Zellen vermieden und beim Fehlen einer stärkeren Bewegung kann auch ein Ausziehen der Mehrzahl der Zellen zu Fäden ausbleiben. Makroskopisch erscheint unter diesen Bedingungen die Blutgelatine oder die Blutwassermischung der Hauptsache nach ungeronnen. Untersuchen wir die nach einiger Zeit am Boden des Gefäßes festklebenden Zellen, so finden wir hier, wohl infolge der mechanischen Wirkung des Auffallens der Zellen auf den Boden des Gefäßes und infolge der zur Untersuchung nötigen Manipulationen, an Stelle der Zellen Fasern; aber wir können hierbei deutlich erkennen, daß die Zellen selbst durch die Bewegungen ausgezogen wurden und so selbst die Fasern bildeten.

3. Fangen wir auf einem Objektträger einen Tropfen Limulusblut in destilliertem Wasser auf, so finden wir nach kurzer Zeit die Zellen gequollen und großenteils nach Art epithelialer Zellen agglutiniert. Wir können nun mit einer feinen Nadel die Zellen unter dem Mikroskop bewegen, dieselben zu Fäden ausziehen und uns hierbei sicher überzeugen, daß die Zellensubstanz selbst klebrig und elastisch ausziehbar ist. Die Anwesenheit einer extrazellulären gelatinösen Masse, welche die Zellen einschließt, läßt sich hierbei nicht erkennen. Wenn das Blut unter ähnlichen Bedingungen in Meerwasser aufgefangen wird, so finden wir gewöhnlich die Zellen durch oft unsichtbare Fäden verbunden. Während im destillierten Wasser die Zellen aufquellen, und das Ausfließen des Protoplasmas größtenteils auszubleiben scheint, findet im Seewasser ein Aufquellen durch Wasseraufnahme nicht statt, das Protoplasma der Zellen fließt zu einem großen Teile aus, und infolgedessen werden die Zellen durch sichtbare oder unsichtbare Fäden verbunden. Destilliertes Wasser hat hingegen auf die Gerinnung eines Fibrinogens keineswegs eine stärker hemmende Wirkung, wie eine 2 bis 4proz. Kochsalzlösung. Die Wirkung von destilliertem Wasser kann also nicht darauf beruhen, daß die Gerinnung eines Fibrinogens verhindert wird, sondern sie

beruht aller Wahrscheinlichkeit nach darauf, daß die Zellen so verändert werden, daß ein Ausfließen des Protoplasmas aus der Zelle verhindert wird.

4. Wenn wir nach dem Ausfließen des Hummerblutes aus dem Tiere das Blut mit destilliertem Wasser mischen (etwa 1 Teil Wasser zu 2 bis 4 Teilen Blut) und dann 1 bis 2mal filtrieren, so daß die Zellen entfernt werden, so erhalten wir ein Blutplasma, welches spontan nicht oder wenigstens längere Zeit nicht gerinnt, wohl aber auf Zusatz eines Stückes Hummerfibrin oder Hummermuskel. Die Quantität des zugesetzten Wassers darf nicht zu groß sein, sonst findet nachher keine Gerinnung statt, der Zusatz von Wasser darf nicht ganz unterbleiben, sonst erfolgt zuweilen bald eine spontane Gerinnung.

Machen wir denselben Versuch mit dem Blut von Callinectes hastatus (Bluecrab), so tritt trotz der Verdünnung des Blutes nach dem Filtrieren oder während des Filtrierens des verdünnten Blutes eine Gerinnung des Plasmas ein. Wir können jedoch auch in diesem Falle die spontane Gerinnung des Plasmas 12 bis 24 Stunden lang oder noch länger aufheben, wenn wir das Blut des Callinectes in einem beträchtlichen Überschuß von auf 70 bis 80° erwärmtem Wasser auffangen und dann sofort filtrieren, wobei das verdünnte Blut abkühlt. Dieses Plasma gerinnt dann auf Zusatz von Fibrin oder Muskel von Callinectes. Die erste Gerinnung des Hummer- und Callinectesblutes wird auf diese Weise nicht verhindert. Durch ähnliche Modifikationen können wir bei anderen Arthropoden, deren Blut eine zweite Gerinnung zeigt, ein fast zellfreies Plasma erhalten, welches durch Zusatz gerinnungserregender Substanzen zum Gerinnen gebracht wird.

Versuchen wir dasselbe mit Limulusblut, so gelingt es auf keine Weise, ein Plasma zu erhalten, welches ähnliche Eigenschaften zeigt. Das Filtrat gerinnt nachher nicht mehr. Das Vorhandensein eines gelösten Fibrinogens läßt sich bei Limulus nicht nachweisen.

Zwar bildet sich im Limulusserum beim Stehen häufig spontan ein flockiger Niederschlag, der in seltenen Fällen zu einer nachträglichen scheinbaren Gerinnung eines großen Teiles des Serums führen kann, wobei makroskopisch der Prozeß als eine zweite Gerinnung erscheinen mag, aber dieser Vorgang ist wahrscheinlich ganz anderer Art. Durch Zusatz von Gerinnung bewirkenden Enzymen (Koaguline des Muskels, Enzyme des fädigen Blutkoagulums) läßt sich dieser Vorgang nicht beschleunigen. Es wurde versucht, durch Auffangen des Blutes in auf 50 bis 80° er-



wärmtem destillierten Wasser und sofortiges Filtrieren die Gerinnung zu hindern. Hierbei wurden Verdünnungen verschiedenen Grades benutzt. Auf keine Weise ließ sich ein unter dem Einfluß von Enzymen gerinnbares Fibrinogen gewinnen.

5. Fangen wir Limulusblut direkt nach dem Ausfließen aus dem Körper in einem Überschuß einer gesättigten Lösung von Magnesiumsulfat auf, so unterbleibt die Gerinnung. Hierzu ist nötig, daß das Blut sich sofort mit der Salzlösung mischt; man fängt deshalb das Blut, falls es nicht in kräftigem Strome ausfließt, am besten so auf, daß das Tier selbst während des Ausfließens in der Salzlösung gehalten wird.

Untersucht man auf einem Objektträger unter dem Mikroskop einige Tropfen des in gesättigter Salzlösung aufgefangenen Blutes, so findet man die meisten Blutzellen isoliert; setzt man dann einen Überschuß destillierten Wassers hinzu, so ordnen sich nach einer bis mehreren Minuten die Zellen in Reihen an. Gleichzeitig wird ein Teil der Zellen selbst durch das destillierte Wasser verändert. Ihre Granula schwinden zum Teil und die Zellen werden klebriger. Filtriert man einen Teil der ungeronnenen Blutsalzlösung, so bleibt die große Mehrzahl der Blutzellen auf dem Filter zurück, ein kleiner Teil der Blutzellen findet sich jedoch, falls gewöhnliche Papierfilter benutzt werden, in der filtrierten Flüssigkeit. Verdünnt man das Filtrat auf dem Objektträger mit destilliertem Wasser, so findet keine Fadenbildung statt. Fügt man in einer Schale zu 9 ccm der nicht filtrierten Blutsalzmischung erst 10 ccm, dann allmählich weitere 20 ccm destilliertes Wasser, so nimmt man in der verdünnten Mischung erst eine diffuse Wolkenbildung wahr; aus diesem diffusen Koagulum bilden sich dann viele Fäden, die sich bald zu einer Anzahl dickerer Fäden zusammenziehen.

Fügt man hingegen zu einer gleichen Menge der filtrierten Blutsalzmischung allmählich die entsprechende Menge destillierten Wassers hinzu, so tritt keine sichtbare Veränderung ein; eine Fadenbildung findet nicht statt. Wir können deshalb den Schluß ziehen, daß das aus einem Teil der Zellen ausfließende Zellprotoplasma selbst durch Agglutination die Fäden hervorbringt.

Aus allen diesen Versuchen und Beobachtungen ergibt sich mit sehr großer Wahrscheinlichkeit, daß die Gerinnung des Limulusblutes lediglich in einer Agglutination der Blutzellen oder des aus Blutzellen ausgeflossenen Protoplasmas besteht. Mit diesem Befunde stehen frühere Beobachtungen in Übereinstimmung, denen zufolge das Protoplasma der Blutzellen unter dem Mikroskop

in lange Fäden ausgezogen werden kann, die sich vom Fibrin in ihrem Aussehen und in ihren physikalischen Eigenschaften (Klebrigkeit, Elastizität, allmähliche Retraktion der Fäden) nicht merklich unterscheiden. Hierbei kann das Protoplasma einer Anzahl aneinandergereihter Blutzellen zu einem einzigen langen Faden verbunden werden.

Was nun für die Gerinnung des Limulusblutes gilt, gilt wahrscheinlich auch für die erste Blutgerinnung anderer Arthropoden, da diese durch ähnliche Mittel beeinflußt wird, wie die Blutgerinnung des Limulus, und da ferner die Blutgerinnung bei Limulus und die erste Gerinnung bei anderen Arthropoden mikroskopisch dieselben Charaktere zeigen. Es würde daraus folgen, daß die Gerinnung des Limulusblutes und die erste Gerinnung des Blutes anderer Arthropoden lediglich einen Agglutinationsvorgang des Zellprotoplasmas darstellen, daß aber die zweite Gerinnung, soweit sie bei Arthropoden beobachtet wird, in der durch Fermente bewirkten (oder beschleunigten) Gerinnung eines Fibrinogens besteht.

In bezug auf das Verhältnis zwischen erster und zweiter Gerinnung finden sich Unterschiede zwischen verschiedenen Arthropoden. Bei Limulus ist die bei der Gerinnung sich bildende gelatinöse Substanz sehr massig; das Gerinnsel retrahiert sich sodann im Laufe der nächsten 12 Stunden sehr stark. Während dieser Zeit findet oft eine anscheinend spontane Ausscheidung von Eiweißstoffen statt. Die Bildung dieses flockigen Gerinnsels unterscheidet sich aber von der zweiten Gerinnung anderer Arthropoden dadurch, daß sie nicht durch dieselben enzymartig-wirkenden Substanzen beeinflußt werden kann, wie die zweite Gerinnung.

Bei Libinia (Spidercrab) findet keine so massige erste Gerinnung statt wie bei Limulus; die sich bildenden Fäden retrahieren sich bald. Eine deutliche zweite Gerinnung findet hier nicht statt, obwohl die Fäden des Gerinnsels, wie wir später sehen werden, Fibrinferment enthalten. Möglicherweise verhindert eine starke Verdünnung des Fibrinogens seine Ausscheidung.

Beim Hummer (Homarus americanus) gleicht die erste Gerinnnung jener bei Libinia; hier tritt aber nach Ablauf der ersten Gerinnung allmählich eine zweite gelatinöse Gerinnung ein. Sie findet hauptsächlich unter dem Einfluß der in dem ersten, dem Zellgerinnsel enthaltenen Fermente statt. Das zweite Koagulum bildet sich daher direkt um die in der ersten Gerinnung gebildeten Fäden. Es retrahiert sich nicht oder nur sehr wenig. Ähnlich



wie das Hummerblut verhält sich das Blut von Platyonychus ocellatus (Ladycrab); hier ist jedoch die erste Gerinnung anscheinend quantitativ unbedeutender wie bei Libinia und beim Hummer*).

Bei Carcinus granulatus (Greencrab) findet nur eine schwache erste Gerinnung statt, ähnlich wie bei Platyonychus, doch bleibt hier auch die zweite unvollständig. Bei Callinectes hastatus (Bluecrab) findet eine starke erste Gerinnung statt; nach 1 bis 2 Minuten schließt sich hieran eine vollständige zweite Gerinnung an, so daß nach Verlauf weniger Minuten das ganze Blut massig geronnen ist, ähnlich wie bei Limulus. Während aber bei Limulus die entstehende gelatinöse Masse durch einen der ersten Gerinnung anderer Arthropoden entsprechenden Prozeß entsteht, findet bei Callinectes eine erste und eine zweite Gerinnung statt. Dies läßt sich durch Auffangen des Callinectesblutes in der Hälfte seines Volums 2proz. Kaliumoxalats oder durch Auffangen des Blutes in einem Überschuß von auf 70 bis 80° erwärmtem destillierten Wasser nachweisen. Durch beide Mittel läßt sich die zweite Gerinnung aufheben.

Aus dem Befund, daß die Gerinnung des Limulusblutes aller Wahrscheinlichkeit nach lediglich in einer Agglutination des Zellprotoplasmas besteht, folgt: 1. daß das fibrinähnliche Fasernetz, das aus diesem Koagulum durch mechanische Einflüsse erhalten werden kann, aus Zellprotoplasma mit Ausschluß eines extrazellulären Bestandteiles hervorgeht, 2. daß die bindegewebsähnlichen Strukturen, die infolge mechanischer Einwirkungen aus den agglutinierten Zellmassen hervorgehen, ebenfalls aus Zellprotoplasma und nicht aus gerinnendem Fibrinogen entstehen, 3. daß das Gerinnsel des Limulusblutes weniger dem gewöhnlichen Blutkoagulum der Wirbeltiere als dem Agglutinationsthrombus entspricht, wie er unter gewissen Bedingungen intra vitam in den Blutgefäßen der Wirbeltiere sich bilden kann.

II.

Über die spezifische Natur der in den Geweben vorhandenen Koaguline bei Wirbellosen.

In früheren Versuchen hatte sich ergeben, daß das Hummerplasma unter dem Einfluß eines Stückes des bei der ersten Ge-

*) In einer früheren Arbeit (Virchows Archiv 173) stellte ich Platyonychus in die Gruppe der Libinia, in der keine zweite Gerinnung stattfindet. Es finden sich da gewisse individuelle Schwankungen, insbesondere kann bei kranken Tieren die Gerinnung ausbleiben. Bei im letzten Sommer ausgeführten Untersuchungen, bei denen mir ein größeres Material als früher zur Verfügung stand, ergab sich, daß beim normalen Platyonychus eine zweite Gerinnung stattfindet.

rinnung sich bildenden Hummerkoagulums oder eines Stückes Hummermuskel gerinnt, daß aber Blutkoagula oder Gewebsstücke von Wirbeltieren, soweit sie untersucht wurden, wirkungslos waren*). Dieser Befund legte einen Vergleich der in den Geweben natürlich vorkommenden Koaguline mit den experimentell erzeugten Präzipitinen, Agglutininen und Lysinen nahe. Es ergab sich dann bei weiteren Untersuchungen an Säugetieren, Vögeln, Reptilien und Amphibien, daß die in den Geweben vorhandenen Koaguline relativ spezifisch sind; sie wirken auf das Blut der Tierart, der sie entstammen oder einer nahe verwandten Tierart stärker ein, wie auf das Blut anderer Tiere**).

Die folgenden Versuche zeigen nun, daß auch bei Wirbellosen die in den Geweben vorhandenen Koaguline spezifisch sind. Zu diesen Versuchen eignet sich nur das Blut von Tieren, die eine größere Blutmenge enthalten, und bei denen eine starke zweite Gerinnung (Gerinnung eines Fibrinogens) stattfindet. Nur zwei Tiere entsprachen diesen Bedingungen in Woods Holl, nämlich der Hummer und Callinectes.

Die Prüfung wurde in der Weise vorgenommen, daß gleich große Stücke verschiedener Gewebe in die Mitte kleiner Petrischälchen, die gleiche Quantitäten Blutplasma von Hummer oder von Callinectes enthielten, gelegt wurden und daß dann der Einfluß dieser Gewebsstücke auf die Gerinnungszeit des Plasmas festgestellt wurde. Kontrollversuche wurden mit verschiedenen Fremdkörpern, wie Filtrierpapier und fein zerteilter Kohle, angestellt. Es wurden ferner in einer Anzahl von Parallelversuchen in das Blutplasma von Callinectes und vom Hummer Gewebsstücke gelegt, die demselben Tiere entnommen waren, und zwar gewöhnlich einem derjenigen Tiere, deren Blut zu diesem Versuche benutzt wurde. Bestand eine Spezifizität, so mußte sich dann zeigen, daß Hummermuskel Hummerplasma relativ stärker beeinflußt als Callinectesplasma, daß aber Callinectesmuskel auf Callinectesplasma einen relativ stärkeren Einfluß hat als auf Hummerplasma. Es handelt sich hierbei um relative, nicht um absolute Größen. Es könnte zum Beispiel im Hummermuskel eine so große Quantität gerinnungsbeschleunigender Fermente vorhanden sein, daß derselbe nicht nur auf Hummerplasma, sondern auch auf Callinectesplasma stärker wirkt als Callinectesmuskel. Dann müßte sich aber in dem Parallelversuch zeigen, daß Callinectesmuskel entweder stärker auf Callinectesplasma wirkt als auf Hummerplasma, oder daß er wenigstens relativ stärker wirkt auf Callinectes- und weniger stark auf Hummerplasma, als Hummermuskel. Die Spezifizität der Enzyme könnte verdeckt werden durch die Anwesenheit einer größeren Menge weniger spezifischer, aber noch nicht völlig unwirksamer Enzyme oder durch eine große Labilität des Fibrinogens, die es möglich macht, daß nicht spezifische Faktoren eine schnelle Gerinnung bewirken.

*) Biological Bulletin, Mai 1903.

**) Medical News 1903. (Eine ausführliche Mitteilung wird in Virchows Archiv erscheinen.)



Die Versuche ergeben jedoch, daß eine Spezifizität der Enzyme sich nachweisen läßt.

Es wurde in 18 Versuchen der Einfluß verschiedener Substanzen auf die Gerinnung des Hummerplasmas geprüft. Es ergab sich, daß Fremdkörper, wie Filtrierpapier und feingepulverte Kohle, welche die Gerinnung des Blutplasmas von Säugetieren und von Vögeln beschleunigen, die Gerinnung des Hummerblutes nicht beschleunigen. Es ergab sich weiter, daß mit einer später zu besprechenden Ausnahme alle Gewebe von Tieren, die nicht zu der Klasse der Arthropoden gehören, keine oder nur eine sehr geringfügige Wirkung auf die Gerinnung des Hummerblutes haben.

Schon früher hatte sich ergeben, daß alle Blutgerinnsel von Wirbeltieren, soweit sie untersucht wurden, wirkungslos waren. Es wurde nun das frische Blutkoagulum eines marinen Fisches, Amphiuma means, geprüft und dasselbe wurde ebenso wie die Leber desselben Tieres völlig unwirksam befunden. Ebenso waren zerstoßene Eier von Fundulus, einem anderen Seefisch, ganz unwirksam oder sie bewirkten nur eine so geringfügige Gerinnung, daß deren Feststellung unsicher blieb. Ferner waren zerstoßene Eier und Hoden von Schildkröten ganz unwirksam. Daß Muskelstücke verschiedener Wirbeltiere unwirksam waren, war schon früher festgestellt worden.

Es wurden ferner Gewebe von wirbellosen Tieren, die nicht zu der Klasse der Arthropoden gehörten, geprüft. Hautmuskel der Anneliden Rhynchobolus und Phascolosoma Gouldii erwiesen sich als ebenso wirkungslos, wie die dem Fuß verschiedener Mollusken entnommenen Muskelstücke (Venus mercenaria, Ensatella americana, Sycotypus). Unter den Coelenteraten wurden Gonionemus Murbachii und Ctenophoren geprüft. Eine Anzahl von Gonionemus wurden zerschnitten und die zerschnittenen Stücke in Blutplasma gebracht. Sie erwiesen sich als unwirksam. Stücke von Ctenophoren waren ebenfalls wirkungslos oder so schwach wirksam, daß gewöhnlich eine gerinnungsbeschleunigende Wirkung nicht mit voller Sicherheit festgestellt werden konnte.

Es wurden ferner zerstoßene Hoden von Arbacia (Echinodermen) geprüft und wirkungslos befunden.

Es war schwierig Blutgerinnsel von anderen wirbellosen Tieren als Arthropoden in zu Versuchen genügender Menge zu erhalten. Blutgerinnsel von Sycotypus (dem möglicherweise ein wenig während des Blutens von dem Tiere abgesonderter Schleim beigemischt war) erwies sich als unwirksam.

Unter den Insekten wurde der Hautmuskel und der Fettkörper einer Raupe (Sphinx quinquemaculata) geprüft; beide erwiesen sich als wirkungslos.

Die Stellung von Limulus polyphemus unter den Arthropoden ist zweifelhaft; derselbe wird gewöhnlich zu den Arachnoiden gerechnet. Muskel von Limulus war völlig ohne Wirkung. Fibrin von Limulus war entweder ganz wirkungslos oder bewirkte nur nach längerer Zeit eine geringfügige Gerinnung*).

Wenden wir uns nun zu den dem Hummer nahestehenden anderen Crustaceen, so erwiesen sich diese als beträchtlich wirksamer, als die Gewebe der fernerstehenden Tiere. Das in der ersten Gerinnung gebildete Fibrin von Libinia canaliculata, Callinectes hastatus, Carcinus granulatus, Platyonychus ocellatus erwies sich in jedem Falle als wirksam. Muskelstücke von Callinectes hastatus waren sehr wirksam, wirksam war auch Muskel von Calianassa Stimpsonii (Shrimp) und von Platyonychus ocellatus. Der Muskel von Libinia und von Carcinus granulatus war unwirksam.

Weit stärker wie die Muskelstücke aller anderen Tierarten wirkte aber Hummermuskel selbst. Ihm am nächsten an Wirksamkeit stand der Muskel von Callinectes. In 18 Versuchen wirkte 17mal der Hummermuskel stärker wie der Muskel von Callinectes, in einem Versuch wirkten beide gleich stark. In diesem einen Versuch wirkten aber Muskelstücke von Callinectes und zwar desselben Tieres, dessen gerinnungsbeschleunigender Einfluß auf Hummerplasma sich als bedeutend erwiesen hatte, stärker auf Callinectesplasma als auf Hummerplasma.

Die gerinnungsbeschleunigende Wirkung anderer Gewebe des Hummers war nicht so bedeutend wie die des Muskels und Fibrins. Ovarien des Hummers wirkten schwächer und Leberpankreas war völlig unwirksam, wohl infolge des in ihm enthaltenen proteolytischen Fermentes.

Auch in diesen Versuchen ließ sich feststellen, daß das in der zweiten Gerinnung gebildete Fibrin viel schwächer gerinnungsbeschleunigend wirkte, wie das in der ersten Gerinnung gebildete. Doch war die absolute gerinnungsbeschleunigende Kraft des zweiten Fibrins bei verschiedenen Tieren verschieden. Bei

*) Blutserum von Limulus bewirkt in dem Blutplasma oder Serum verschiedener anderer Arthroproden Niederschläge. Diese waren nicht die Ursache, daß die Gerinnung auf Zusatz von Limulusgeweben unterblieb, da auch sorgfältig abgetrocknete Gewebsstücke, die keine Niederschläge bewirkten, ebenso wirkungslos waren.



Callinectes, bei dem die zweite Gerinnung sehr schnell auf die erste folgt und in kurzer Zeit beendet ist, war auch das zweite Fibrin recht wirksam. Bei Platyonychus hingegen war das zweite Koagulum wirkungslos.

Während die Blutgerinnsel fernerstehender Tiere, wie der Wirbeltiere, des Limulus und wahrscheinlich auch des Sycotypus ganz (Wirbeltiere, Sycotypus) oder fast ganz (Limulus) ohne Wirkung auf Hummerplasma sind, läßt sich innerhalb der Crustaceen eine genaue Spezifizität für die bei der ersten Gerinnung gebildeten Fibrine dem Hummerblut gegenüber nicht nachweisen. Oft sind Callinectes-, Libinia- und Hummerfibrin ungefähr gleich wirksam auf Hummerplasma. Hummermuskel ist zuweilen stärker, zuweilen etwas schwächer wirksam wie die Fibrine der obengenannten Tiere.

Ähnliche Tatsachen fanden wir beim Wirbeltierblut. Während eine Spezifizität der in Muskel und Leber der verschiedenen Tierspezies enthaltenen gerinnungserregenden Substanzen nachgewiesen werden konnte, ließ sich eine solche für Blutgerinnsel nicht nachweisen. Eine sehr ausgesprochene Spezifizität ergab sich in der Wirkung der in den Muskeln verschiedener Tierspezies enthaltenen Koaguline auf das Hummerblut, indem nur die Muskeln dem Hummer näher stehender Tiere eine bedeutendere Wirkung auf das Blut ausübten und unter diesen Hummermuskel selbst am stärksten wirksam war.

Das Blutplasma von Callinectes wurde in 9 Versuchen geprüft. Es ergab sich, daß Gewebe von Tieren, die nicht zu der Klasse der Arthropoden gehörten, gar keine oder nur eine sehr schwache gerinnungsbeschleunigende Wirkung ausübten. Auch Limulusfibrin war nicht oder nur sehr wenig wirksam. Hingegen zeigte sich Limulusmuskel wirksamer gegenüber Callinectesplasma wie gegen Hummerplasma. Doch war auch hier die Wirkung des Limulusmuskels merklich schwächer wie die des Callinectesmuskels, welch letzterer stärker wirkte wie der Muskel irgend eines anderen der Prüfung unterzogenen Tieres.

Hummermuskel war mit Ausnahme eines unter neun Versuchen, wo er gleich stark wirkte, stets schwächer wirksam als Callinectesmuskel. In dem einen Versuch wirkte aber ein Muskelstück von demselben Hummer auf Hummerplasma stärker als ein Muskelstück desselben Callinectes, dessen Wirksamkeit auf Callinectesplasma geprüft worden war. Muskel von Libinia war Callinectesplasma gegenüber ebenso wirkungslos wie Hummerplasma gegenüber. Ovarien von Callinectes waren ohne Wirkung.

Um zu solchen Versuchen brauchbar zu sein, mußte das Blutplasma von Callinectes in auf 70 bis 80° erwärmtem Brunnenwasser aufgefangen und sofort filtriert werden. Durch diese Mittel wurde es stark verdünnt. Solches Blutplasma war daher dem Säugetierplasma vergleichbar, das in der Weise gewonnen war, daß etwa 2 bis 3 ccm Blut in 35 ccm auf 56 bis 57° erwärmter 0,8proz. Kochsalzlösung aufgefangen wurden (mit sofort erfolgender Filtration). Solches Blut gerann auf Zusatz von Blutgerinnseln, Muskelstücke hatten jedoch gewöhnlich keinen stärkeren Einfluß wie chemisch inerte Fremdkörper. Trotzdem koagulierte solches verdünntes Plasma leichter spontan als 10fach verdünntes, nach Delezennes Methode aufgefangenes Gänseplasma, welches auf Zusatz von Vögeln entnommenen Muskelstücken bald gerann*).

In ähnlicher Weise gerinnt das stark verdünnte und kurze Zeit erwärmte Callinectesplasma (falls die Verdünnung nicht zu stark war) nach 12 bis 24 Stunden spontan. Falls dieses Plasma sehr stark verdünnt war, verlor der Muskel von Callinectes seine gerinnungsbeschleunigende Wirkung, die Blutgerinnsel von Libinia, Callinectes und Hummer waren dann aber noch wirksam**). Auch hier konnte eine spezifische Wirkung des Blutgerinnsels von Callinectes gegenüber den Blutgerinnseln von Hummer und Libinia nicht erkannt werden.

Auch auf Callinectesplasma übten chemisch inerte Fremdkörper wie Filtrierpapier und gepulverte Kohle keine koagulationsbeschleunigende Wirkung aus.

Wir sahen, daß der Muskel von Libinia gegenüber Hummer- und Callinectesplasma völlig unwirksam ist; dasselbe gilt für den Muskel von Carcinus granulatus gegenüber Hummerplasma. (In bezug auf seine Wirkung gegen Callinectesplasma war er wegen Mangels an Material nicht geprüft worden.) Diese beiden Tiere stehen nun dem Hummer und Callinectes relativ nahe; dieselben haben aber das gemeinsam, daß bei ihnen eine zweite Gerinnung nicht oder nur in sehr geringem Grade stattfindet. Das Blut dieser Tiere enthält also wahrscheinlich nur wenig Fibrinogen. Die Tatsache, daß gerade diese beiden Tiere auch kein nachweisbares Koagulin in ihren Muskeln enthalten, dürfte vielleicht

*) On the coagulation of blood in its relation to thrombosis usw. Montreal Medical Journal, July 1903.

**) Genaue quantitative Bestimmungen des jeweiligen Verdünnungsgrades des Plasmas wurden nicht ausgeführt, da bei der relativen Spärlichkeit des Materials und bei der Notwendigkeit, die Versuche schnell auszuführen, sich die Gelegenheit hierzu nicht bot.

für die früher von mir ausgesprochene Vermutung sprechen, daß die in den Geweben der Wirbeltiere enthaltenen spezifischen Koaguline einer spezifischen Einwirkung des Fibrinogens, also einer Art Autoimmunisation ihre Entstehung verdanken.

Neben den spezifisch wirkenden Koagulinen finden wir bei Wirbeltieren auch nicht spezifische. Lösungen von Wittes Pepton und Bouillonkulturen gewisser Bakterien beschleunigen z. B. in vitro die Koagulation des Gänseplasmas. Es ließ sich erwarten, daß auch unter den Wirbellosen sich solche nicht spezifische Substanzen finden würden. Dementsprechend wurde auch beobachtet, daß zerstoßene Eier gewisser Tiere wie Arbacia, die nicht zur Klasse der Arthropoden gehörten, auf das Hummerplasma einen koagulierenden Einfluß haben. Ähnlich wirkten auch zerstoßene Eier von Limulus. Eier von Asterias (Seestern) waren nur wenig oder gar nicht wirksam. Auch auf das Blutplasma von Callinectes wirkten Eier von Arbacia etwas gerinnungsbeschleunigend. Doch waren in diesen Versuchen die in den Eiern von Arbacia enthaltenen Substanzen weniger wirksam als die im Muskel von Hummer oder Callinectes vorhandenen Stoffe.

Hummermuskel, der $^1/_2$ Stunde auf 49 bis 50° erwärmt worden war, hatte seine gerinnungsbeschleunigende Wirkung eingebüßt.

Aus diesen Versuchen können wir den Schluß ziehen, daß der Muskel des Hummers Stoffe enthält, welche die Gerinnung des Hummerplasmas spezifisch beschleunigen, ferner daß der Muskel von Callinectes die Koagulation des Callinectesplasmas spezifisch beschleunigende Stoffe enthält, daß die Muskelextrakte einiger anderer Arthropoden auch noch wirksam sind, aber schwächer wie der derselben Tierspezies angehörige Muskel; weiterhin, daß das Blutgerinnsel von Wirbeltieren sowie das Blutgerinnsel von Wirbellosen, soweit sie nicht zu den Crustaceen gehören, sofern sie bisher geprüft wurden (Limulus, Sycotypus) wirkungslos sind, daß das Blutgerinnsel der Crustaceen wirksam ist, daß aber innerhalb dieser eine spezifische Wirkung der Blutgerinnsel nicht nachweisbar ist.

Versuch VII möge als Beispiel angeführt werden.

I.

12 h. 30 min. Nachmittag. (7. August 1903.)

1. 4 ccm Callinectesplasma und Callinectesmuskel (großes Stück). 1,30 p. m. vollständig geronnen.

2. 4 ccm Callinectesplasma und Callinectesmuskel (mittelgroßes Stück). 1,35 p. m. starkes Koagulum um das Muskelstück. 2,25 Koagulum etwas größer. 4,45 völlig geronnen.

3. 4 ccm Callinectesplasma und Callinectesmuskel (mittelgroßes Stück). 1,30 p. m. Koagulum um den Muskel und am Boden, 4,45 p. m. fast ganz geronnen, 7 p. m. unverändert.

4. 4 ccm Callinectesplasma und Callinectesmuskel (kleines Stück). 1,30 p. m. fast ganz geronnen, 7 p. m. unverändert.

5. 4 ccm Callinectesplasma und Callinectesovarium (zerschnitten). Keine Koagulation (oder Spur), am nächsten Morgen: keine Koagulation.

6. 4 ccm Callinectesplasma und Callinectesfibrin (mittleres Stück). 1,30 p. m. ganz koaguliert.

7. 4 ccm Callinectesplasma und Callinectesfibrin (kleines Stück). 1,30 p. m. ganz koaguliert.

8. 4 ccm Callinectesplasma und Hummermuskel (mittelgroßes Stück). 1,30 p. m. keine Koagulation, 4,45 Spur von Koagulation am Muskel (?). 7 p. m. etwas Koagulation am Boden.

9. 4 ccm Callinectesplasma und Hummermuskel (großes Stück). 2,30 p. m. keine Koagulation, 4,45 p. m. geringfügige Koagulation (?), 7 p. m. dasselbe.

10. 4 ccm Callinectesplasma und Hummermuskel (sehr großes Stück). 7 p. m. keine Koagulation.

11. 4 ccm Callinectesplasma und Hummermuskel (großes Stück). 7 p. m. keine Koagulation.

12. 4 ccm Callinectesplasma und Hummerfibrin (kleines Stück). 1,30 p. m. fast ganz geronnen, 4,45 p. m. ganz geronnen (aber nicht so dicht wie unter dem Einfluß von Callinectesfibrin).

13. 4 ccm Callinectesplasma und Hummerfibrin. 1,30 p. m. ganz koaguliert.

14. 4 ccm Callinectesplasma und Libiniamuskel. 7 p. m. keine Koagulation.

15. 4 ccm Callinectesplasma und Libiniafibrin (sehr kleines Stück). 1,30 p. m. lokales Koagulum um Fibrin, 2,30 p. m. ganz koaguliert.

16. 4 ccm Callinectesplasma und Limulusmuskel (großes Stück). 2,30 p. m. keine Koagulation, 4,45 p. m. ein wenig Koagulum, 7 p. m. Das Plasma bildet ein sehr reiches Koagulum.

17. 4 ccm Callinectesplasma und Limulusfibrin (großes Stück). 1,30 p. m. keine Koagulation; ein wenig Präzipitat, 4,45 p. m. dasselbe. 7 p. m. Präzipitat, ein wenig Koagulum (?).

18. 4 ccm Callinectesplasma und Stücke von Ctenophoren. 1,30 p. m. keine Koagulation, 4,45 p. m. zweifelhaft, ob geringe Koagulation, 7 p. m. dasselbe am nächsten Morgen, großenteils koaguliert. (Gewöhnlich war die Wirkung schwächer.)

19. 4 ccm Callinectesplasma und Hoden von Arbacia (zerschnitten und zerstoßen). 4,45 p. m. keine Koagulation, 7 p. m. keine Koagulation.

20. 4 ccm Callinectesplasma und Ovarium von Arbacia. 4,45 p. m. keine Koagulation, 7 p. m. keine Koagulation, am nächsten Morgen etwas Koagulation.

21. 4 ccm Callinectesplasma und mehrere Stückchen Filtrierpapier. 4,45 p. m. keine Koagulation, am nächsten Morgen keine Koagulation.

II. Stärker verdünntes Plasma von Callinectes wird um 3,10 p. m. mit den Gewebsstücken versetzt.

1. 4 ccm Callinectesplasma und Callinectesmuskel. 7 p. m. keine Koagulation. (Stück mit Bakterien infiziert.)

2. 4 ccm Callinectesplasma und Callinectesmuskel. 4,45 p. m. geringe Koagulation am Muskel, 7 p. m. etwas Koagulation am Boden; am nächsten Morgen etwas Koagulation.

3. 4 ccm Callinectesplasma und Callinectesmuskel. 7 p. m. sehr geringfügiges lokales und Bodenkoagulum; am nächsten Morgen ein Teil des Plasmas koaguliert.

4. 4 ccm Callinectesplasma und Hummermuskel. 7 p. m. keine Koagulation; am nächsten Morgen keine Koagulation.

5. In einem ähnlichen Versuch dasselbe Resultat wie in 4.

6. 4 ccm Callinectesplasma und Callinectesfibrin. 4,45 p. m. $^2/_3$ Koagulation (Koagulation wenig fest), 7 p. m. fast ganz koaguliert.

7. 4 ccm Callinectesplasma und Hummerfibrin. 4,45 p. m. $^1/_2$ koaguliert, 7 p. m. dasselbe.

8. 4 ccm Callinectesplasma und Callinectesovarien. 7 p. m. keine Koagulation.

9. 4 ccm Callinectesplasma und Arbaciahoden. 7 p. m. keine Koagulation.

10. 4 ccm Callinectesplasma und Arbaciaovarien. 4,45 p. m. ein wenig koaguliert, 7 p. m. etwas Koagulation am Boden; am nächsten Morgen dasselbe.

11. 4 ccm Callinectesplasma und 4 Tropfen 10 proz. Kaliumoxalat (Niederschlag, welcher auf Zusatz von Oxalat entsteht, wird abzentrifugiert) und Callinectesfibrin und ein Stück Callinectesmuskel. 7 p. m. keine Koagulation.

III. Blutplasma des Hummers und Gewebsstücke, 3,10 p. m.

1. 4 ccm Hummerplasma und Callinectesovarien. 7 p. m. keine Koagulation; am nächsten Morgen keine Koagulation.

2. 4 ccm Hummerplasma und Arbaciahoden. 7 p. m. keine Koagulation, am nächsten Morgen keine Koagulation.

3. 4 ccm Hummerplasma und Hummerfibrin (der ersten Gerinnung entstammend). 4,45 p. m. $^1/_3$ koaguliert, 7 p. m. $^2/_3$ koaguliert; am nächsten Morgen ganz koaguliert.

4. 4 ccm Hummerplasma und Hummermuskel. 4 p. m. beginnende Koagulation, 4,45 p. m. $^1/_3$ koaguliert; am nächsten Morgen dasselbe.

5. 4 ccm Hummerplasma und Hummermuskel. 4 p. m. beginnende Koagulation, 4,45 p. m. mehr wie die Hälfte koaguliert; am nächsten Morgen dasselbe.

6. 4 ccm Hummerplasma und Callinectesfibrin. 4,45 p. m. Koagulation um das Fibrin und am Boden des Schälchens, 7 p. m. dasselbe; am nächsten Morgen ganz koaguliert.

7. 4 ccm Hummerplasma und Callinectesmuskel. 4 p. m. keine Koagulation, 4,45 p. m. ganz geringfügige Koagulation um das Muskelstück, 7 p. m. ganz geringe Koagulation am Boden des Schälchens; am nächsten Morgen kein Fortschritt.

8. 4 ccm Hummerplasma und Callinectesmuskel. 4,45 p. m. keine Koagulation, 7 p. m. keine Koagulation, am nächsten Morgen keine Koagulation.

9. 4 ccm Hummerplasma und Arbaciaovarien. 4,45 p. m. keine Koagulation.

III.

Im folgenden soll eine kurze Zusammenstellung gewisser Unterschiede und Ähnlichkeiten gegeben werden, die in dem Verhalten der Koagulation des Blutes von Wirbeltieren (Vögel, Meerschweinchen) und von Wirbellosen (Arthropoden) bestehen*).

1. Bei Wirbeltieren wie bei Wirbellosen findet neben der Koagulation eines Fibrinogens eine Agglutination körperlicher Blutelemente statt (Blutplättchen — Blutzellen der Arthropoden).

2. Bei beiden Tierklassen kann die Agglutination der Blutzellen resp. Blutplättchen unabhängig von der Gerinnung eines Fibrinogens erhalten werden.

3. Bei Wirbellosen kann die Masse agglutinierter Zellen leicht in fibrinähnliche Fäden umgewandelt werden. Die agglutinierten Zellmassen haben bei Wirbellosen eine stark koagulierende Wirkung auf das im Plasma vorhandene Fibrinogen.

Die agglutinierten Zellmassen des Gänseblutes hatten bei ähnlicher Versuchsanordnung, wie sie bei Wirbellosen versucht wurde, eine relativ schwächere Einwirkung auf die Gerinnung des Blutplasmas der Gans.

4. Die Wirkung der Gewebskoaguline (Muskeln, Leber, Lymphdrüsen der Wirbeltiere, Muskeln der Wirbellosen) ist bei Wirbeltieren wie bei Wirbellosen eine spezifische. Eine ebenso deutliche Spezifizität der in den Blutkoagulis vorhandenen gerinnungsbeschleunigenden Faktoren läßt sich weder bei Wirbeltieren noch bei Wirbellosen nachweisen.

5. Bei starker Verdünnung des Callinectesplasmas ebenso wie des Gänseplasmas können die Gewebskoaguline unwirksam werden, während die Blutkoagula noch eine Gerinnung bewirken, obwohl bei stärkerer Konzentration des Plasmas die Gewebskoaguline ebenso stark oder stärker wirksam sein können, wie die in den Blutkoagulis enthaltenen Fermente.

6. Die erste Gerinnung der Wirbellosen läßt sich mit der Agglutinationsthrombose der Wirbeltiere (wie sie nach der Ansicht der Mehrzahl der Forscher stattfindet) vergleichen. Die Koagulation eines Fibrinogens läßt sich nicht bei allen Wirbellosen nachweisen.

7. Blutegelextrakt hebt die Gerinnung des Wirbeltierblutes auf. Es hat keinen merkbaren gerinnungshemmenden Einfluß auf das Blut der Wirbellosen.

---

*) Diese Befunde wurden an anderen Stellen von mir eingehender dargestellt, hier soll nur eine Zusammenfassung gegeben werden.

8. In vitro beschleunigt Wittes Pepton die Gerinnung des Gänseplasmas; dasselbe hat einen stark hemmenden Einfluß auf die Gerinnung des Hummerplasmas. In beiden Fällen ist Merks Pepton weniger oder gar nicht wirksam.

9. Für die Gerinnung des Wirbeltierblutes wie des Blutes der Wirbellosen ist die Anwesenheit von Kalzium von großer Bedeutung.

10. Fremdkörper (z. B. Filtrierpapier) beschleunigen die Koagulation des Wirbeltierblutes, und erweisen sich ohne Einfluß auf die Gerinnung des Blutplasmas der Wirbellosen.

Kürzere Mitteilungen.

1. Über einen milchweißen Ascites bei Carcinom.

Von Dr. phil. **H. Wolff**, chem. Assistenten a. d. I. med. Univ.-Klinik Berlin.

Aus dem Laboratorium der Abteilung für Krebsforschung.
(Dir.: Geheimrat Prof. Dr. v. Leyden.)

Der in der letzten Zeit durch verschiedene interessante Arbeiten vermehrten Literatur über die Ursache des chylösen Aussehens von Ascitesflüssigkeiten möchte ich einen Fall zufügen, der, soweit mir bekannt ist, ein Gegenstück bisher nicht gehabt hat*).

Das in Frage stehende Transsudat stammt von einem Fall allgemeinen Carcinoms der Bauchorgane**).

Die Ascitesflüssigkeit ist milchweiß, hat ein spez. Gew. von 1,020, durch Schütteln mit Äther wird Fett extrahiert, ohne daß eine Aufhellung erfolgt. Auch durch Versetzen mit Kali- oder Natronlauge wird das Aussehen nicht beeinflußt, ebenso wenig wie durch Ätherextraktion nach Alkalizusatz. Gegen Chloroform zeigt die Flüssigkeit ein eigentümliches Verhalten. Zuerst setzt sich das Chloroform gut ab, bald darauf (etwa nach $^1/_2$ bis $^3/_4$ Stunde) erstarrt die Flüssigkeit zu einem dicken Brei, der im Laufe von 24 Stunden dünnflüssig wird, so daß sich das Chloroform wieder gut absetzen kann: es enthält jedoch nun eine in kaltem Alkohol wenig lösliche, leicht schmelzende Verbindung, die, wie ich später feststellen konnte, Cholesterinölsäureester ist.

Bei der Bestimmung der Eiweißfraktionen durch Ammonsulfat war schon das Filtrat vom Euglobulin (also nach $^1/_3$ Sättigung) klar. Sonderbar war, daß der Niederschlag sich vollständig auf der Oberfläche der Flüssigkeit absetzte. Nach Filtrieren und Waschen wurde der auf dem Filter befindliche Rückstand mit Wasser aufgenommen und dabei eine — dem ursprünglichen Ascites ganz ähnliche — Emulsion erhalten. Aus dieser wurde wieder durch $^1/_3$ Sättigung mit Ammonsulfat das Euglobulin gefällt und der Versuch gemacht, Niederschlag und Flüssigkeit durch Zentrifugieren zu trennen, um das — bei der etwas klebrigen Beschaffenheit der Fällung — recht lang dauernde Filtrieren zu ersparen. Dabei zeigte sich folgende Erscheinung:

Der größte Teil des Niederschlages schwamm auf der Oberfläche als ein halbfester, zusammenhängender Kuchen; ein kleiner Teil hatte sich

---

*) Einen ähnlichen, aber mit vorliegendem sicher nicht identischen Fall beschreibt Ascoli (Clin. med. A. 1900, Juni).

**) Durch sechs- bis achtmalige Punktion wurden etwa 8 Liter einer milchigweißen Flüssigkeit entleert, von der mir etwa $^1/_3$ zur Verfügung stand. Der Fall stammt aus dem Anfang des Jahres 1903.

— wie sonst gewöhnlich — am Boden abgesetzt. Daß dieser wirklich Euglobulin war, konnte leicht durch Bestimmung der Fällungsgrenzen ermittelt werden. Er löste sich in Wasser zu einer nur wenig opaleszierenden Flüssigkeit, die durch KOH völlig klar wurde. Der oben schwimmende Teil des Niederschlages wurde mit $^1/_3$ gesättigter Ammonsulfatlösung aufgeschwemmt und wieder zentrifugiert; nunmehr setzte sich nichts am Boden ab. Dadurch wurde der Gedanke nahe gelegt, daß die Trennung nicht durch zufällige physikalische Umstände verursacht war, sondern ihren Grund in einer Verschiedenheit der Zusammensetzung beider Teile hatte*). Dies scheint mir dadurch bestätigt zu werden, daß der sich unten absetzende Teil stets gleiche Stickstoffmengen enthält (s. u.).

Um die Eigenschaften des oben schwimmenden Teils des Globulins, der die trübende Substanz — sei es chemisch gebunden oder mechanisch mitgerissen — enthielt, näher kennen zu lernen, dialysierte ich die wässerige Emulsion einer größeren Menge davon. Während der Dialyse fiel der Körper vollständig in groben Flocken aus. Diese bildeten mit verdünnter Kochsalz- oder Sodalösung eine milchige Emulsion, in der durch Erhitzen auf etwa 45° das Eiweiß (samt der anhaftenden Verbindung) koaguliert werden konnte. Ammon- und Magnesiumsulfat fällten den Körper, Chlornatrium tat dies (auch in konz. Lösung) nicht. Der größte Teil der Fällung wurde mit kaltem Alkohol und Äther ausgewaschen; geringe Mengen mitgerissenen Fettes ließen sich so leicht entfernen. Nunmehr wurde reichlich mit heißem Alkohol und dann mit etwa 30° warmem Äther extrahiert. Beim Erkalten schied sich eine kristallinische, etwas buttrige Substanz ab, die sich in Chloroform und Äther leicht, in kaltem Alkohol fast gar nicht löste. Vom restierenden Eiweiß wurde ein Teil im Vakuum, ein Teil bei 60° getrocknet. Während ersterer ein trockenes gelblichweißes Pulver bildete, aus dem sich mit kaltem oder warmem Äther nur Spuren extrahieren ließen, nahm letzterer zunächst ein glasiges, dann ein öliges Aussehen an. Nach dem Erkalten ging beim Schütteln mit Äther eine reichliche Menge einer Substanz in diesen über, die sich als mit der durch Alkoholäther vorher ausgezogenen identisch erwies.

Dieselbe schmolz bei 41 bis 47°, war optisch aktiv und zwar berechnete sich $[\alpha]_D$ zu — 18,0°; so daß die Vermutung nahe lag, daß die Substanz Cholesterinölsäureester**) sei. Der positive Ausfall der Liebermann-Burchardschen Probe, die Verseifung, die statt 58,5 Proz. Cholesterin 58,1 Proz. ergab, und schließlich die Analyse bestätigten diese Behauptung. Nicht die schwere Extrahierbarkeit des Cholesterinesters, die ja durch physikalische Ursachen herbeigeführt sein konnte und beim Blutserum schon von Hürthle***) beobachtet worden ist, sondern vielmehr der große Unterschied der Extrahierbarkeit vor und nach dem Erwärmen, schien mir darauf hinzudeuten, daß der Ester nicht mechanisch beigemengt, sondern chemisch gebunden oder molekular

*) Man könnte sich ja vorstellen, daß der oben schwimmende Teil ein Gemisch von Euglobulin mit dem trübenden Agens sei und ein Teil des Euglobulins mechanisch mitgerissen würde.

**) Für diesen wird $[\alpha]_D$ zu — 18,48 angegeben.

***) Zeitschr. f. phys. Chem. 21, 331.

an das Euglobulin angelagert ist. Dies scheint mir durch folgenden Versuch noch wahrscheinlicher gemacht zu werden:

0,1 g des Esters wurden mit 15 ccm Pferdeserum so lange geschüttelt, bis sich eine Art Emulsion bildete. Aus dieser konnten mit Äther 0,061 g direkt ausgeschüttelt werden. Aus der Fällung des Euglobulins ließen sich schon durch je 3malige Extraktion 0,030 mit heißem Alkohol und Äther entfernen, so daß ein großer Unterschied in der Extrahierbarkeit des Esters aus der künstlichen Emulsion und aus der Ascitesflüssigkeit besteht.

Auch das Verhalten zu Chloroform (s. o.) scheint mir mit der Annahme einer Bindung des Esters an Eiweiß in Einklang zu stehen, noch mehr das Verhalten gegen Essigsäure: Verdünnte Essigsäure ruft einen Niederschlag weder in der ursprünglichen Ascitesflüssigkeit, noch in der isolierten Euglobulinfraktion hervor. Durch Versetzen mit $^1/_4$ bis $^1/_3$ des Volumens an Eisessig erhält man dagegen eine dicke Fällung, die sofort filtriert einen Stickstoffgehalt von 0,1008 g (auf 100 ccm Flüssigkeit berechnet) enthält. Nach einiger Zeit filtriert, zeigt sie einen geringeren N-Gehalt, offenbar weil das Globulin abgespalten und gelöst wird*). Besonders beachtenswert ist der verhältnismäßig geringe Unterschied in dem Stickstoffgehalt mit dem des Euglobulins (s. u.).

Ich lasse nunmehr die Bestimmungen der Eiweißfraktionen folgen. Dieselben wurden nach der von Joachim angewandten Methode ausgeführt**) und gaben, wie unten ersichtlich, recht gute Übereinstimmung. Nur wurden bei der Euglobulingruppe in der oben geschilderten Weise durch Zentrifugieren 2 Teile, die ich als „freies" und „gebundenes" Euglobulin bezeichnen will, getrennt. Um bei dieser Trennung die äußeren Bedingungen möglichst verschieden zu gestalten und eine zufällige Übereinstimmung nach Möglichkeit auszuschließen, wurde der Niederschlag vor dem Zentrifugieren mit $^1/_2$ gesättigter Ammonsulfatlösung auf folgende Volumina aufgeschlemmt: bei a auf 25, b auf 50, c auf 100 ccm. Der obenschwimmende Kuchen (s. o.) ließ sich (mit einer Ausnahme, wo diese Bestimmung natürlich unterlassen wurde) leicht und ohne am Rand zu haften abgießen.

Die Stickstoffmengen sind auf 100 ccm berechnet (die in Klammern stehenden Zahlen sind die durch Multiplikation mit 6,25 sich ergebenden Eiweißmengen).

		a (aus 20 ccm best.) g N	b (aus 25 ccm best.)	c (aus 25 ccm best.)	Durchschnittlich
Euglobulin	freies	0,0091	0,0112	0,0106	0,0103
		(0,057)	(0,070)	(0,066)	(0,064)
	gebundenes	0,1050	0,1065	verunglückt	0,1057
		(0,656)	(0,666)		(0,661)
Pseudoglobulin		0,0329	0,0336	unterlassen	0,0333
		(0,206)	(0,210)		(0,208)
Albumin		0,4655	0,4665	„	0,4660
		(2,909)	(2,916)		(2,912)

*) Bei längerer Dauer der Einwirkung der Säure läßt sich auch mehr Cholesterinester ausäthern!

**) Arch. für d. ges. Phys. 23, 561.

Es ist nach Joachim (loc. cit.) eine allgemeine Erscheinung, daß Ascitesflüssigkeit bei Carcinom hohe Albuminwerte (durchschnittlich 64,9 Proz. des Gesamteiweiß) zeigt und daß die Euglobulinwerte relativ niedrig sind (etwa 12,4 gegenüber 22,6 Pseudoglobulin). Die erste dieser Erscheinungen trifft auch auf den von mir untersuchten Fall zu, und zwar in sehr hohem Grade, dagegen zeigt das Euglobulin im Verhältnis zum Pseudoglobulin einen auffallend hohen Wert:

Vom Gesamteiweiß fallen dem Albumin 75,7 Proz., dem Pseudoglobulin nur 5,4 und dem Euglobulin 18,9 Proz. zu.

Bei den mit a und b bezeichneten Eiweißbestimmungen wurde auch der mit dem Euglobulin fallende Cholesterinölsäureester gewogen: Auf 100 berechnet betrug seine Menge bei a 0,939, bei b 0,953 g, also 9,4 bis 9,5 promille, so daß in der gesamten Ascitesflüssigkeit etwa 80 g dieser Substanz enthalten waren!

Zum Schluß möchte ich noch das Ergebnis der Gesamtanalyse angeben. Dieselbe wurde nach der im Lehrbuch der physiologisch-chemischen Analyse von Hoppe-Seyler angegebenen Methode ausgeführt, nur wurde auch hier das Eiweiß vor dem Extrahieren mit Alkoholäther etwa 2 Stunden auf 50 bis 60° erwärmt. (Die Zahlen sind Mittelwerte aus 3 recht gut übereinstimmenden Analysen.)

Eiweiß (gewogen und verascht) = 40,1 promille [die Summe der Fraktionen ergibt 38,45 promille]; anorg. Salze 7,1 promille, darunter hauptsächlich Kalk (5,2) und etwas Eisen (0,5), 0,72 nicht wasserlöslich; Extraktivstoffe 18,2 promille, davon ätherunlöslich 3,1 promille; Cholesterin 5,60 promille (aus dem Ester berechnet sich 5,53, so daß, wie es scheint, das ganze Cholesterin aus diesem stammt); Lecithin nur in Spuren vorhanden.

Der Gehalt an Stickstoff in 1000 ccm beträgt 6,72 g, von denen 6,15, also 91,5 Proz. auf Eiweiß entfällt. Albumosen und Peptone sind nicht. Nukleoproteide nicht mit Sicherheit nachweisbar.



XIII.

Über die Wirkung des Schwefels auf Eiweißkörper.

Nach gemeinsam mit Dr. Max Hausmann (St. Gallen) ausgeführten Versuchen berichtet von A. Heffter.

Aus dem Institut für medizinische Chemie und Pharmakologie der Universität Bern.

Vor einigen Jahren hat der eine von uns[1]) gezeigt, daß Kakodylsäure durch gewisse tierische Organe (in erster Linie Leber, Magen und Darm) zu Kakodyloxyd reduziert wird. Bei diesem Vorgange handelte es sich nicht um Enzymwirkungen, denn die reduzierende Kraft eines Leberextraktes oder Leberbreis blieb auch nach dem Kochen erhalten. Ferner hatte sich ergeben, daß das Eierklar des Hühnereis ebenfalls reduzierende Wirkungen ausübt. Auch diese Eigenschaft wird durch Kochen nicht vernichtet: das koagulierte Eiweiß bildet ebenfalls Kakodyloxyd.

Diese Beobachtungen waren die Veranlassung, uns näher mit den reduzierenden Wirkungen des Hühnereiweißes und der tierischen Gewebe zu beschäftigen und zwar speziell mit der Bildung von Schwefelwasserstoff aus fein verteiltem Schwefel. Dieser von de Rey-Pailhade[2]) zuerst beobachtete Vorgang wird von ihm auf ein Philothion genanntes Ferment zurückgeführt, das im alkoholischen Hefeextrakt, im Eiereiweiß und in tierischen Organen vorkommen soll. Es gehört zu den von französischen Autoren[4]) und neuerdings auch von E. Buchner und Hahn[5]) angenommenen Hydrogenasen oder Reduktasen.

I. Die Bildung von Schwefelwasserstoff aus Schwefel durch Eierklar.

Verreibt man Eierklar mit gereinigten Schwefelblumen oder präzipitiertem Schwefel und bringt die Mischung in ein Kölbchen, in dessen Hals ein Bleiacetatpapier befestigt ist, so bemerkt man nach etwa 15 Minuten eine rasch zunehmende Schwärzung des Papiers. Noch rascher und zur Demonstration geeigneter verläuft

der Versuch, wenn an Stelle des Schwefelpulvers eine alkoholische Schwefellösung, etwa $^1/_5$ bis $^1/_4$ Volumen des Eierklars, zugesetzt wird. Dann beginnt die H_2S-Entwickelung bereits nach 3 bis 5 Minuten. Das geschwärzte Bleipapier kann man durch ein neues ersetzen, das sich wiederum schwärzt usw. Man sieht, daß dieser Vorgang längere Zeit andauert, und wenn er beendet ist, das Papier sich also nicht mehr färbt, kann die H_2S-Bildung durch Zusatz von Eierklar wieder hervorgerufen werden. Eine Änderung in seinem Aussehen zeigt das Eierklar während und nach der H_2S-Entwickelung nicht.

Rösing[5]) hat unter O. Nasses Leitung das merkwürdige Verhalten des Eierklars zu Schwefel näher zu erforschen gesucht und dabei festgestellt, daß die H_2S-Bildung ein zeitlich begrenzter Vorgang ist, der nach etwa 2 Tagen sein Ende erreicht hat. Antiseptika, falls sie nicht das Eiweiß fällen, fand Rösing ohne Einwirkung auf die H_2S-Bildung. Dagegen soll die Reaktion aufgehoben werden, wenn man Neutralsalze in genügender Menge zufügt, und nach späterer Verdünnung mit Wasser wieder eintreten. Vollständig vernichten konnte Rösing die Fähigkeit, H_2S zu bilden, durch Hitzekoagulation des Eierklars und durch Einwirkung oxydierender Mittel, wie Ferricyankalium, Kaliumpermanganat oder Jodlösung. Soweit Rösings Resultate, auf Grund deren er die Auffassung des Reduktionsvorganges als Enzymwirkung im Sinne de Rey-Pailhades ablehnt. Auf die von O. Nasse[6]) gegebene Erklärung des Prozesses wird später zurückzukommen sein.

Unsere Versuche zielten darauf hin, neben einer Nachprüfung der Rösingschen Angaben die quantitativen Verhältnisse des Vorganges zu untersuchen und außerdem festzustellen, welcher Bestandteil des Eierklars der H_2S-bildende Körper sei. Daß es sich um einen Eiweißstoff handelte, war nach den Rösingschen Versuchen als ziemlich sicher anzunehmen.

Das von uns verwendete vom Dotter ganz freie Eierklar*) wurde durch gründliches Schütteln mit Glasscherben von den Membranen befreit und durch Gaze koliert. In allen den Fällen, in denen das Eierklar nicht sofort weiterverarbeitet oder zu kurzdauernden Versuchen benutzt wurde, lösten wir darin soviel Fluornatrium auf, als einem Gehalt von 2 Proz. entsprach. Hierdurch wird die Reduktionswirkung anscheinend nicht beeinträchtigt und

*) In allen Versuchen benutzten wir Hühnereiweiß. Jedoch ist gelegentlich festgestellt worden, daß Eierklar vom Ei der Gans und der Truthenne das gleiche Verhalten gegen Schwefel zeigt.



das Eierklar bleibt wochenlang unverändert. Noch nach 14 Tagen — später haben wir nicht geprüft — tritt auf Schwefelzusatz prompt die H_2S-Entwickelung auf, während ein vorher eingehängtes Bleipapier unverändert blieb. Zusatz von anderen Konservierungsmitteln wie Toluol oder Chloroform beeinflußt die Entwickelung von H_2S ebenfalls nicht. Ohne diese antiseptische Vorsichtsmaßregel ist man an warmen Tagen, namentlich bei länger dauernden Versuchen, infolge eintretender bakterieller Zersetzung leicht Irrtümern ausgesetzt.

Die Temperatur scheint keine wesentliche Rolle zu spielen. Die Reaktion auf dem Bleipapier tritt bei 40° vielleicht etwas eher und stärker ein als bei Zimmertemperatur, weil die Löslichkeit des H_2S geringer wird.

Die alkalische Reaktion des Eierklars ist für den Vorgang nicht von Bedeutung, wie aus den später zu besprechenden quantitativen Versuchen ersichtlich ist. Wird indessen bei Säurezusatz die Konzentration der H-Ionen so groß, daß eine Reaktion auf Kongo eintritt, dann wird die H_2S-Bildung stark abgeschwächt und bei weiterem Zusatz von Säure völlig gehemmt. Sie tritt wieder auf nach Abstumpfung der Säure mit Alkali bis zum Verschwinden der Kongoreaktion. Was speziell die Blausäure anlangt, so hat sie auch in größeren Mengen keinen Einfluß auf den Reduktionsprozeß. Sie wird durch den entstehenden H_2S teilweise in Rhodanwasserstoffsäure umgewandelt.

Bezüglich des Einflusses von Neutralsalzen gibt Rösing an, daß sie „in genügender Menge“ zugefügt die Bildung von H_2S aufheben. So soll bei einem Gehalt des Eierklars von etwa 27 Proz. NaCl auch bei längerem Stehen das Bleipapier nicht geschwärzt werden. Unsere Versuche haben das nicht bestätigt. Folgende Salze: NaCl, KCl, $MgSO_4$, NH_4Cl, NH_4NO_3 bis zur Sättigung in Eierklar eingetragen heben die H_2S-Entwickelung nicht auf. Sie wird allerdings, wie unten gezeigt werden wird, beeinträchtigt. Bei Sättigung mit Ammoniumsulfat und -phosphat, wodurch Ausfällung der Eiweißkörper eintritt, wird kein H_2S mehr gebildet.

Ein geringer Zusatz von $^1/_5$ Volumen Alkohol (95 Proz.) zum Eierklar beeinflußt den Reduktionsprozeß nicht, sondern hat infolge der eintretenden besseren Löslichkeit des Schwefels eher einen günstigen Einfluß. Höherer Alkoholgehalt (2 Volumen) hebt die H_2S-Bildung völlig auf. Als das ausgefällte Eiweiß nach mehrstündigem Stehen abfiltriert und mittels Zerreiben im Mörser gründlich mit Wasser gewaschen worden war, gaben weder das mit Wasser

verdünnte Filtrat noch das Waschwasser nach Schwefelzusatz H_2S-Reaktion. Dagegen trat diese sehr stark auf, als das auf dem Filter verbliebene Koagulum mit wenig Wasser und Schwefel innig verrieben wurde. Es wird also die H_2S-liefernde Substanz durch Alkohol unlöslich, ohne dabei die Wirkung auf Schwefel einzubüßen.

Auf Grund dieser Beobachtung und wenn wir uns daran erinnerten, daß durch Kochen koaguliertes Eiweiß aus Kakodylsäure Kakodyloxyd bildet, mußten wir die Angabe Rösings, daß die Hitzekoagulation des Eierklars die Wirkung auf Schwefel aufhebt, stark bezweifeln. In der Tat zeigte sich, daß durch Kochen das Vermögen, aus Schwefel H_2S zu bilden, nicht aufgehoben wird.

Eierklar wurde in essigsaures siedendes Wasser eingetropft und 15 Minuten lang im Sieden erhalten. Das abfiltrierte und gründlich ausgewaschene Koagulum schwärzt, mit Schwefel und Wasser verrieben, prompt das Bleipapier, Filtrat und Waschwasser sind ohne Wirkung. Durch Trocknen des koagulierten Eiweißes im Exsikkator geht die H_2S-bildende Eigenschaft nicht verloren. Wir haben auf diese Weise konserviertes Eiweiß noch nach sieben Wochen wirksam gefunden.

Weiterhin haben wir auf verschiedene Methoden gefälltes Eiweiß geprüft. Mit Bleiacetat gefälltes Bleialbuminat mit Wasser und Schwefel angerührt färbt sich allmählich dunkel infolge Bildung von Schwefelblei. Auch die mittels Karbolsäure oder Ferrocyankalium und Essigsäure erhaltenen Niederschläge haben die H_2S bildende Eigenschaft nicht eingebüßt. Dagegen wurde sie vermißt bei den mit Eisenchlorid und Kupfersulfat erzeugten Albuminaten. Offenbar war durch die oxydierende Wirkung, die diese Oxyde ausüben, das Eiweiß verändert worden.

Unterwirft man das koagulierte wirksame Eiereiweiß der hydrolytischen Spaltung durch Pepsin-Chlorwasserstoffsäure, so erweist sich das entstehende Albumosen-Pepton-Gemenge nach Abstumpfung der freien Salzsäure bis zum Verschwinden der Kongoreaktion als wirkungslos. Die Fähigkeit, H_2S zu bilden, geht also bei der Spaltung durch Pepsin verloren.

Um die Menge des gebildeten H_2S zu messen, wurde folgender Weg eingeschlagen.

Das zur Untersuchung dienende mit 2 Proz. NaFl versetzte Eierklar — es kamen in den meisten Versuchen 120 ccm zur Anwendung — wurde mit 1 bis 2 g reinem Schwefel*) vermischt, der behufs besserer

*) Sulfur depuratum der Ph. Helvet. sorgfältig mit verdünntem Ammoniak, Alkohol und Äther gewaschen, im Vakuum getrocknet und über Schwefelsäure aufbewahrt.



Benetzung vorher mit einem kleinen Teil des Eierklars angerieben worden war. Diese Mischung befand sich in einem Kolben, dessen doppelt durchbohrter Stopfen Röhren zum Durchleiten von Gas trug. Das zum Austreiben des gebildeten H_2S dienende Gas (Wasserstoff, Kohlensäure, Luft) passierte vor dem Eintritt in den Kolben je eine Waschflasche mit Wasser und Bleinitratlösung. Von einem Eintauchen des Gaszuleitungsrohres in die Eiweißschwefelmischung haben wir wegen der lästigen Schaumbildung Abstand genommen, nachdem sich gezeigt hatte (Versuch I und II), daß hierdurch keine Unterschiede in der ausgetriebenen H_2S-Menge verursacht wurden. Das Zuleitungsrohr endigte dicht über der Oberfläche des Eierklars. Der Kolben befand sich in einem Wasserbad, das mit Ausnahme der zwei ersten Versuche auf 37 bis 40° gehalten wurde. Die Dauer des einzelnen Versuches betrug 48 Stunden, da in Übereinstimmung mit Rösing festgestellt worden war, daß in dieser Zeit die H_2S-Entwickelung in der Regel beendet ist. Eine Stunde vor Abschluß des Versuches wurde die Temperatur des Wasserbades auf 80 bis 90° gesteigert, um den in der Flüssigkeit gelösten H_2S auszutreiben. Der gebildete H_2S wurde in einem Zehnkugelrohr, das mit einer ammoniakalischen Lösung von reinem Wasserstoffperoxyd beschickt war, aufgefangen. Nach Beendigung des Versuchs wurde der in ein Becherglas gegossene Inhalt des Rohres 5 bis 10 Minuten im Sieden erhalten und dann die gebildete Schwefelsäure in üblicher Weise als Baryumsulfat bestimmt.

Die Ergebnisse der Versuche folgen, auf 100 ccm Eierklar berechnet, in tabellarischer Zusammenstellung.

Nr. des Versuches	Schwefelzusatz	Durchgeleitet	Schwefelwasserstoff gebildet von 100 ccm Eierklar in mg	Bemerkungen
I	1,0	H_2	1,70	Bei Zimmertemperatur. Gas in die Flüssigkeit geleitet.
II	1,0	H_2	1,36	Wie oben. Das Eierklar hatte vorher mit Na Fl-Zusatz zwei Tage im Brutschrank bei 40° gestanden.
III	1,0	H_2	1,99	Bei 40°. Eierklar mit H Cl bis zur deutlichen Reaktion auf Lackmus angesäuert.
IV	1,0	CO_2	2,35	Bei 40°. Mit Essigsäure angesäuert.
V	2,0	Luft	1,77	Bei 40°. Mit Essigsäure angesäuert. Das Eierklar hatte drei Tage lang mit Na Fl-Zusatz im Zimmer gestanden.
VI	2.0	„	0,66	Bei 40°. Das Eierklar mit 27,6 Proz. Na Cl versetzt. Die Entwickelung war nach 48 Stdn. noch nicht beendet.
VII	2,0	„	1,32	Bei 40°. 100 ccm Eierklar durch Kochen mit essigsaurem Wasser koaguliert, Koagulat abfiltriert, ausgewaschen, mit Schwefel und 50 ccm 2 proz. Na Fl-Lösung verrieben.

Die Versuche I bis V zeigen, daß 100 ccm 1,36 bis 2,35 mg H_2S zu bilden vermögen. Die beobachteten Unterschiede sind unabhängig von der Menge des zugesetzten Schwefels, wahrscheinlich auch von der Temperatur und von der Reaktion des Eierklars. Es ist eher anzunehmen, daß der wechselnde Gehalt des Eierklars an wirksamer Substanz die Ursache ist.

Ob Kohlensäure auf die H_2S-Bildung oder Austreibung begünstigend einwirkt, kann aus dem einzigen angestellten Versuch nicht beurteilt werden.

Ein längeres Aufbewahren des Eierklars bei Luftzutritt, auch bei höherer Temperatur beeinträchtigt, wie Versuch II und V zeigen, die Menge des gebildeten H_2S nicht wesentlich. Es wird noch zu untersuchen sein, ob längeres Durchleiten von Sauerstoff anders wirkt.

Aus Versuch VI geht hervor, daß ein Zusatz von 27,6 Proz. NaCl die Wirkung des Eierklars auf Schwefel abschwächt, so daß in 48 Stunden nur etwa $^1/_3$ bis $^1/_2$ der sonst gefundenen H_2S-Menge gefunden wurde. Da der Versuch vor Beendigung der Entwickelung abgebrochen werden mußte, so läßt sich vorläufig nicht entscheiden, ob es sich nur um eine Verlangsamung der Reaktion handelt.

Der Versuch VII endlich liefert den zahlenmäßigen Beweis für die oben mitgeteilte Beobachtung, daß auch die koagulierten Eiweißkörper des Eierklars auf Schwefel wirken. Wenn man die Schwierigkeit bedenkt, die bei der Wechselwirkung zweier unlöslicher Körper für den vollständigen Ablauf der Reaktion besteht, so darf man aus der erhaltenen Menge von 1,32 mg H_2S den Schluß ziehen, daß durch die Koagulation die reduzierende Wirkung der Eiweißkörper nicht vermindert worden ist.

Wie erwähnt, haben wir bei diesen Versuchen das Eierklar zuletzt eine Stunde lang auf 80 bis 90° erhitzt, wodurch es natürlich koaguliert. Es ist eine bekannte Tatsache, daß Eiereiweiß beim Kochen H_2S abspaltet und Rubner[14]) hat nachgewiesen, daß bei mehrstündigem Sieden die gebildete Menge ganz beträchtlich ist. Es war daher nicht unmöglich, daß durch unser Verfahren eine Fehlerquelle gegeben wurde. Indessen zeigte ein Versuch, daß bei sechsstündigem Erhitzen von Eierklar ohne Schwefel auf 90° nur sehr wenig H_2S abgegeben wurde. Wir fanden 0,0022 g $BaSO_4$ entsprechend 0,3 mg H_2S. Da wir nur während einer Stunde auf diese hohe Temperatur erwärmt haben, dürfte dieser Fehler kaum in Betracht kommen.

Wenden wir uns nun zur Beantwortung der Frage: welchem Bestandteil des Eierklars kommt diese auffallende Eigenschaft

zu? Das Ovomukoid war von vornherein ausgeschlossen, da wir gezeigt hatten, daß das Filtrat des gekochten Eierklars mit Schwefel nicht reagierte. Die wirksame Substanz war demnach in den gerinnbaren Stoffen zu suchen, wofür ja auch der Versuch VII deutlich sprach.

Nach Ausfällung der Globuline durch Halbsättigung mit Ammonsulfat gibt das Filtrat nach Schwefelzusatz deutliche Reaktion auf Bleipapier, während das Gesamtglobulin, in gleicher Weise behandelt, meist nur Spuren von H_2S entwickelt. Durch gründliches Auswaschen und Verreiben mit 40proz. Ammonsulfatlösung, das bis zum Verschwinden der Biuretreaktion fortgesetzt wurde, gelang es, die Globuline so zu reinigen, daß sie mit Schwefel keine Spur H_2S mehr bildeten.

Aus dem die Albumine enthaltenden Filtrat konnte die H_2S-bildende Substanz durch $^3/_4$ Sättigung mit Ammonsulfat abgeschieden werden, woraus zu schließen ist, daß die Albumine oder eines derselben der wirksame Bestandteil ist. Mit Sicherheit können wir das vom kristallisierten Ovalbumin behaupten. Der Güte des Herrn Dr. K. Spiro in Straßburg verdanken wir ein vor 4 Jahren hergestelltes Präparat, dessen wässerige Lösung 1 : 50 sehr schön mit Schwefel reagierte. So kommen wir also zu dem Ergebnis, daß die H_2S-bildende Eigenschaft des Eierklars dem kristallinischen Ovalbumin zukommt, und lassen es vorläufig unentschieden, ob das Konalbumin ebenfalls auf Schwefel wirkt.

Außer der Wirkung auf Schwefel und der eingangs erwähnten auf Kakodylsäure ist noch ein anderer durch Eierklar verursachter Reduktionsvorgang seit langem bekannt. Binz und Schulz[7]) haben die Bildung von arseniger Säure aus Arsensäure durch Eierklar beobachtet. Auch wir haben nachweisen können, daß bei viertägigem Digerieren von Eierklar mit Natriumarsenat und 2 Proz. NaFl bei 40° eine kleine Menge arseniger Säure gebildet wird. Ferner haben wir untersucht, ob auch auf Nitrate das Eierklar reduzierend einwirkt. Erst nach 24 Stunden war salpetrige Säure deutlich nachweisbar*), nach 48 Stunden war die Reaktion stark. Der Verlauf der Reaktion war also recht langsam. Daß nach dieser Zeit die reduzierende Fähigkeit des Eierklars noch nicht erschöpft war, zeigte sich dadurch, daß, als nun Schwefel hinzugefügt wurde, das Bleipapier sich mit der gewöhnlichen Schnelligkeit schwärzte.

Kristallisiertes Ovalbumin zeigt das gleiche Verhalten.

---

*) Mit Sulfanilsäure und α-Naphtylamin in essigsaurer Lösung.

Jodate werden sehr schnell zu Jodiden reduziert, was sich besonders deutlich bei Anwendung von koaguliertem Eiweiß oder Ovalbumin zeigen läßt.

Natriumsulfit und -bisulfit werden von Eierklar nicht reduziert, dagegen gibt Natriumthiosulfat, zu 10 Proz. dem Eierklar zugefügt, eine spärliche und rasch vorübergehende H_2S-Entwickelung, die sich an Intensität und Dauer mit jener aus Schwefel nicht vergleichen läßt. Bei geringeren Konzentrationen trat keine Reaktion ein.

Auf fein verteiltes Selen (durch Reduktion von SeO_2 mit unterphosphoriger Säure erhalten) ist Eierklar ohne Wirkung und bildet keinen Selenwasserstoff, wie wir übereinstimmend mit Rösing feststellen konnten. Ebensowenig konnte die Bildung von Phosphorwasserstoff aus Phosphor nachgewiesen werden. Methylenblau oder Indigschwefelsäure werden durch Eierklar und Ovalbumin nicht reduziert, dagegen tritt nach Zufügung von Schwefel infolge der Einwirkung des nun entstehenden H_2S rasch Entfärbung ein.

Hinsichtlich des Verhaltens gegen die genannten Farbstoffe unterscheidet sich das Eierklar scharf von den Hefeauszügen, also dem Philothion de Rey-Pailhades und dem Hefepreßsaft, dessen reduzierende Wirkung kürzlich Hahn[4]) beschrieben hat. Die Reduktion dieser Farbstoffe und des Selens wird durch einen labileren Körper, als der ist, der die H_2S-Bildung verursacht, veranlaßt, denn die Wirkung auf Methylenblau geht beim Aufbewahren des Hefepreßsaftes bei Luftabschluß im Eisschrank innerhalb weniger Tage verloren und wird durch einstündiges Erhitzen auf 55 bis 60° fast ganz vernichtet. Die H_2S-bildende Substanz des Preßsaftes ist etwas widerstandsfähiger, wird aber auch durch Erhitzen auf 65° wesentlich beeinträchtigt.

Für das Eierklar haben wir gezeigt, daß seine reduzierende Wirkung auf Schwefel durch Erhitzen auf 100° und tagelanges Aufbewahren nicht geschädigt wird. Dagegen wird sie, wie schon Rösing gefunden hat, durch kleine Mengen oxydierender Agenzien, wie Kaliumpermanganat, Jod, Ferricyankalium, aufgehoben. Wir können ihnen noch das Ferrichlorid und das Kupfersulfat anreihen. Es läßt sich leicht zeigen, daß Ferricyankalium und Ferrichlorid einige Stunden mit koaguliertem Eiereiweiß in Berührung in die entsprechenden Ferroverbindungen umgewandelt werden. Das Eiweiß hat dann seine Wirkung auf Schwefel verloren.

Schließlich möchten wir noch die von Pozzi-Escot[3]) behauptete Identität der Katalase mit den H_2S-bildenden Substanzen

berühren, Bach und Chodat[8]) haben bereits für Pilz- und Leberkatalase das Irrige dieser Angabe gezeigt. Daß sie für das Eierklar ebenfalls nicht zutreffend ist, geht schon daraus hervor, daß es sich hier bei der H_2S-Bildung gar nicht um einen Fermentprozeß handelt. Unsere Versuche haben aber auch auf anderem Wege gezeigt, daß die Katalase des Eierklars nicht mit der H_2S-liefernden Substanz identisch ist.

Unseres Wissens hat zuerst Gianuzzi[9]) die katalytische Wirkung des Eierklars auf Wasserstoffperoxyd beobachtet. Nach seinen Versuchen zersetzt das rohe Eiweiß Wasserstoffperoxyd stärker, als solches, aus dem durch starkes Verdünnen und CO_2-Einleitung das Globulin ausgefällt worden war. Wie wir gefunden haben, wird durch Halbsättigung mit Ammonsulfat die katalysierende Substanz ganz ausgefällt. Der Globulinniederschlag, der keinen H_2S bildet, zeigt starke katalysierende Wirkung.

II. Das Verhalten der Sekrete gegen Schwefel.

Beim Vermischen von Speichel mit Schwefel tritt meistens nach kürzerer oder längerer Zeit eine Schwärzung des Bleipapiers ein. Indessen ist diese Wirkung ohne Zweifel auf die Tätigkeit der im Speichel vorhandenen Mikroorganismen zurückzuführen, denn nach Zusatz von Toluol, Chloroform oder Fluornatrium bildet der Speichel nie H_2S.

Magensaft und Galle verhalten sich gegen Schwefel ganz negativ.

Etwas eingehender müssen wir uns mit der Kuhmilch beschäftigen, in der Raudnitz[15]) eine „Reduktase" nachgewiesen haben will, die mit Schwefel H_2S erzeugt, bei Essigsäurefällung ausfällt, durch 0,3 Proz. Rhodankalium stark, durch 0,5 Formalin vollkommen gehemmt wird. Schon Rösing hat das Verhalten der Milch zum Schwefel studiert und dabei teils positive, teils negative Ergebnisse gesehen. Unsere eigenen Versuche verliefen anfangs ebenso wechselnd, jedoch stellte sich schließlich heraus, daß bei Milchproben, die mehrere Stunden lang keine H_2S-Reaktion gegeben hatten, diese nach 1 bis 2tägigem Stehen im Brutschrank sehr intensiv auftrat. Der Verdacht, daß es sich bei der H_2S-Produktion ausschließlich um Bakterienwirkung handeln möchte, wurde bestätigt durch das vollständig negative Verhalten von Milch, die mit Chloroform, Salizylsäure oder NaFl versetzt war. Süße Molke verhielt sich natürlich ebenso negativ, wenn sie mit Antisepticis versetzt war. Andernfalls trat die H_2S-Reaktion nach 24 Stunden oder später auf, konnte aber durch Zusatz weniger

Tropfen einer Milch, die H_2S entwickelte, schon nach 2 bis 3 Stunden hervorgerufen werden.

Hierdurch scheint uns bewiesen zu sein, daß die Einwirkung der Milch auf Schwefel ausschließlich auf Mikroorganismen zurückzuführen ist.

III. Das Verhalten des Blutes gegen Schwefel.

Die Fähigkeit des Blutes verschiedener Tierarten, aus Schwefel Schwefelwasserstoff zu bilden, ist von de Rey-Pailhade und später von Rösing beobachtet worden.

Versetzt man frisches oder defibriniertes Blut*) mit feinverteiltem Schwefel, so ist nach einigen Minuten die Entwickelung von H_2S nachzuweisen, hört aber, falls nicht Luft durchgeleitet wird, bald auf. Beim Vergleich des Schwefelblutes mit einer schwefelfreien Kontrollprobe bemerkt man, daß jenes nach einigen Stunden merklich dunkler gefärbt ist. Die spektroskopische Untersuchung zu diesem Zeitpunkt zeigt einen scharf begrenzten Sulfhämoglobinstreifen.

Welcher Bestandteil des Blutes verursacht die H_2S-Bildung? Was zunächst das Fibrin anlangt, so war es von vornherein wahrscheinlich, daß es bei dem Vorgange nicht beteiligt sei, da defibriniertes Blut sich ebenso wirksam auf Schwefel zeigte, als das Gesamtblut. Wir haben indessen mit frischem, sorgfältig gewaschenem Fibrin einen Versuch angestellt. Weder bei Zimmertemperatur noch bei 40° konnte H_2S-Entwickelung nachgewiesen werden. Auf die Angabe Rösings, daß Fibrin beim Kochen mit Schwefel Schwefelwasserstoff bildet, wird später zurückzukommen sein.

Das durch Zentrifugieren gewonnene klare Serum verhielt sich ebenso negativ wie das Fibrin. Dagegen bildete das Blutkörperchensediment mit Schwefel H_2S. Wir haben die Blutzellen mit destilliertem Wasser ausgelaugt, die Stromata durch erneutes Zentrifugieren abgetrennt und konnten dann feststellen, daß die wässerige Lösung mit Schwefel reagierte, während die Stromata sich negativ verhielten. Der H_2S-bildende Bestandteil des Blutes ist also in den Blutkörperchen in wasserlöslicher Form enthalten. Die Vermutung, daß das Hämoglobin dabei im Spiele sei, bestätigte sich nicht, denn kristallisiertes Hämoglobin bildet keinen H_2S aus Schwefel.

IV. Tierische Organe und Schwefel.

De Rey-Pailhade hat angegeben, daß eine Anzahl tierischer Organe (Muskel, Gehirn, Niere, Milz, Hoden, Leber, Pankreas)

*) Zu allen Versuchen diente Hundeblut.

„Philothion“ enthalten, d. h. aus Schwefel H_2S bilden. Durch Rösing wurde diese Beobachtung dahin vervollständigt, daß die vollständig vom Blut befreiten Organe diese Wirkung ausüben, und ferner angegeben, daß durch Zusatz von Salzen und kleinen Mengen Ferricyankalium die H_2S-Entwickelung verhindert werde.

Wir haben die Reduktion des Schwefels durch die genannten Organe völlig bestätigen können. Nach Zusatz von Schwefelblumen zu einem mit Chloroform, Toluol oder NaFl versetzten Organbrei wird ein eingehängtes Bleipapier bei Zimmertemperatur oder bei 40° in 10 bis 30 Minuten geschwärzt. Bei Anwendung von schwefelhaltigem Alkohol in kleiner Menge wird wie beim Eierklar die Reaktion etwas beschleunigt. Besonders schnell tritt die H_2S-Bildung beim Gehirn ein, nicht viel weniger schnell mit Darmschleimhaut, die sich auch durch ein besonders starkes Reduktionsvermögen gegenüber der Kakodylsäure auszeichnet. Auch die mit 2proz. NaFl-Lösung hergestellten Auszüge der Organe zeigen das gleiche Verhalten gegen Schwefel, wenn auch in abgeschwächtem Maße. Der extrahierte Rückstand wirkt in allen Fällen stärker als das Extrakt. Die H_2S-Bildung findet ebenso wie beim Eierklar sowohl bei schwach alkalischer wie bei saurer Reaktion statt. Stärkere Konzentrationen der H- oder OH-Ionen heben sie auf. Ebenso wird sie wie beim Eierklar durch Alkohol in stärkerer Konzentration [etwa 50 Proz.] gehemmt.

Wir haben, um die quantitativen Verhältnisse der H_2S-Bildung in den Organen kennen zu lernen, eine größere Anzahl Versuche mit frischer Kalbsleber angestellt.

Die Methodik bei diesen Versuchen wich insofern von der beim Eierklar angewendeten ab, als zur Absorption des H_2S N/100-, bisweilen auch N/10-Jodlösung diente. Zur Vermeidung von Fehlern, die infolge des Entweichens von Jod entstehen konnten, war hinter dem die Jodlösung enthaltenden Absorptionsgefäß ein gleiches mit N/100-Natriumthiosulfatlösung eingeschaltet. Durch Titration wurde am Ende des Versuchs ermittelt, wieviel Jod im ersten Gefäß reduziert und wieviel in das zweite Gefäß übergerissen worden war. Die Differenz ergab die dem gebildeten Schwefelwasserstoff entsprechende Jodmenge. Zur Verdrängung des H_2S diente in allen Fällen Luftdurchleitung. Der das Leber-Schwefelgemisch enthaltende Kolben stand in einem 40° warmen Wasserbade. Als Antiseptikum erhielt der mit physiologischer Kochsalzlösung vermischte Leberbrei einen Zusatz von Toluol, seltener Chloroform.

Zunächst wurde durch eine Anzahl Kontrollversuche, bei denen der Kolben nur mit Schwefel und Wasser bzw. mit Leberbrei und Wasser beschickt war, die Genauigkeit der Methode geprüft. Es ergab sich für beide Versuchsanordnungen, daß eine Menge von 0,6 bis 1,0 ccm N/100-Jodlösung, im Mittel 0,75 ccm

nach einstündigem Luftdurchleiten bei 40° reduziert wurde, entsprechend einer Menge von 0,13 mg H_2S. Dieser Fehler ist bei den unten mitgeteilten Zahlen nicht berücksichtigt worden.

Zunächst wurde untersucht, wieviel H_2S ein Leber-Schwefelgemisch während mehrerer Stunden direkt nach dem Zusammenbringen produzierte. Es ergab sich, daß im Mittel aus mehreren Versuchen 0,57 mg H_2S pro Stunde durch den Luftstrom ausgetrieben wurde.

Als Beispiel diene folgender Versuch:

100 g Leber mit 200 ccm Kochsalzlösung und 3 g Schwefel bildeten

während der 1. Stunde 0,68 mg H_2S
" " 2. " 0,66 " "
" " 3. " 0,46 " "
" " 4. " 0,57 " "
also während 4 Stunden 2,37 mg H_2S

Es ergab sich aus diesem und ähnlichen Versuchen, daß eine deutliche Zu- oder Abnahme des H_2S während der ersten 4 bis 6 Stunden nicht zu erkennen, und daß der Prozeß der H_2S-Bildung in diesem Zeitraum bei weitem nicht beendigt war. Da die bei diesen bereits 2 Jahre zurückliegenden Versuchen zur Verfügung stehenden Einrichtungen derart waren, daß eine länger dauernde Durchleitung nicht tunlich erschien, stellten wir den mit der Leber-Schwefelmischung und Toluol bzw. Chloroform beschickten Kolben mit sorgfältig verschlossenen Zu- und Ableitungsröhren 48 Stunden lang in den Brutschrank. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Kolben möglichst rasch mit den Zu- und Ableitungsschläuchen verbunden und der H_2S zuerst bei 40°, dann bei rasch auf 95° gesteigerter Temperatur ausgetrieben. Wir erhielten bei zwei in dieser Weise angestellten Versuchen die großen Werte von 52,6 und 43,6 mg H_2S für 100 g Lebersubstanz. Verweilte die Leber-Schwefelmischung längere Zeit — 7 Tage — im Brutschrank, so wurde erheblich weniger H_2S gefunden. Worauf das Verschwinden des gebildeten H_2S beruht, ob es sich um eine Zersetzung oder nur um eine Bindung durch das Lebereisen handelte, ist nicht weiter untersucht worden.

Jedenfalls geht aus diesen Versuchen hervor, daß die Reaktion innerhalb einer gewissen Zeit beendigt ist. Wie beim Eieralbumin ist der Prozeß der H_2S-Bildung ein zeitlich begrenzter. Indessen scheinen auch die in der Leber sich abspielenden autolytischen Vorgänge die Reduktion des Schwefels merklich zu beeinflussen. Ein qualitativer Versuch gab, soweit Schnelligkeit und Stärke der Verfärbung des Bleipapiers ein Urteil gestatten, darüber Auskunft.

Leberbrei mit 2 proz. Fluornatriumlösung wird bei Zimmertemperatur mehrere Tage der Autolyse überlassen. In gewissen Zwischenräumen

werden Proben herausgenommen, filtriert und Filtrat und Rückstand getrennt mit Schwefel versetzt. Die H_2S-Reaktion trat ein:

	im Rückstand	im Filtrat
nach 5 Stunden	mäßig	mäßig
nach 1 Tag	„	nicht
nach 2 Tagen	stark	sehr stark
nach 3 Tagen	schwach	mäßig
nach 5 Tagen	nicht	nicht

Wir sehen also, daß, nachdem die Reaktion innerhalb der ersten 48 Stunden an Intensität zugenommen hatte, sie nach 3 Tagen bereits abgeschwächt und nach 5 Tagen gar nicht mehr auftrat. Entweder ist in dieser Zeit der die H_2S-Entwicklung bedingende Prozeß bereits abgelaufen oder die wirksame Substanz ist dann bereits zerstört oder unwirksam.

Aus diesem Versuche ist ferner ersichtlich, daß die auf den Schwefel wirkende Substanz teilweise in Lösung geht. Es gelingt indessen weder durch Wasser noch durch Salzlösungen, sie völlig zu extrahieren. Wir haben eine größere Anzahl von H_2S-Bestimmungen in Leberextrakten, die mit verschieden langer Extraktionsdauer bei verschiedenen Temperaturen hergestellt waren, ausgeführt. Auf ihre Anführung kann verzichtet werden, da die gefundenen Werte ziemliche Unterschiede zeigen. Es sei nur erwähnt, daß wir aus 2 Extrakten, die durch ein- und vierstündige Maceration aus 100 g Leber gewonnen worden waren, während einstündigen Durchleitens 0,36 und 0,38 mg H_2S erhalten haben, während 100 g Lebersubstanz unter gleichen Bedingungen, wie oben erwähnt, im Mittel 0,57 mg lieferten.

Die weitere Erforschung und Erklärung dieses Vorganges ist bei dem kompliziert zusammengesetzten Lebergewebe wesentlich schwerer als bei dem Eierklar, besonders nachdem Magnus-Levy[10]) gezeigt hat, daß bei der Autolyse der Leber kräftige Reduktionen verlaufen, wobei Wasserstoff und sogar Schwefelwasserstoff entstehen. Freilich ist die Menge des letzteren so gering, daß sie sich der Geruchswahrnehmung und der quantitativen Bestimmung entzieht, und wir können aus nachher zu besprechenden Gründen annehmen, daß dieser H_2S bei unseren Untersuchungen keinen erheblichen Fehler verursacht hat. Die Bildung von Wasserstoff, wenn auch zunächst nur bei der aseptischen Autolyse erwiesen, würde die reichliche Entstehung von H_2S in unseren Versuchen vollauf erklären, denn wie von Cossa[11]) und später

Heffter[12]) nachgewiesen wurde, bildet naszierender Wasserstoff bei gewöhnlicher Temperatur aus Schwefel, der frei von SO_2 ist, H_2S. Die Angabe Magnus-Levys, daß die Wasserstoffentwicklung während der ersten zwei Tage ziemlich lebhaft war und dann sehr gering wurde, würde mit unseren Erfahrungen in bezug auf den Verlauf der H_2S-Bildung ganz gut stimmen. Freilich haben wir mit antiseptischen Zusätzen gearbeitet und in diesem Falle erleiden nach übereinstimmenden Angaben die autolytischen Umsetzungen eine wesentliche Verzögerung und Abschwächung. Angenommen indessen, daß dieser Umstand im vorliegenden Falle bedeutungslos sei, so hindert doch eine wichtige Tatsache daran, die Entstehung des H_2S ausschließlich auf die bei der Autolyse stattfindenden Reduktionsprozesse d. h. den naszierenden Wasserstoff zu beziehen: durch Abkochen wird die H_2S-Bildung nicht aufgehoben. Das ist nicht nur für die Leber, sondern auch für eine Reihe anderer Organe (Muskel, Darmschleimhaut, Gehirn) festgestellt worden. Abelous und Ribaut[13]) haben in einer kurzen Notiz, die erst nach Abschluß unserer Versuche uns bekannt wurde, für die Leber wenigstens die gleiche Beobachtung mitgeteilt. Übrigens war dieses Verhalten der gekochten Leber nach den eingangs erwähnten Erfahrungen mit Kakodylsäure zu erwarten.

Hinsichtlich des Verhaltens gegen Schwefel wurde folgendes beobachtet. Trägt man frische Leber oder eines der genannten Organe allmählich in siedendes Wasser ein und hält die Mischung einige Minuten bis $^1/_2$ Stunde lang im Sieden, so gibt sowohl das Filtrat wie der Rückstand nach dem Erkalten und Zufügen von Schwefel eine deutliche H_2S-Reaktion. Die Ursache, warum das Filtrat reduzierende Wirkungen ausübt, wurde in der Anwesenheit kleiner Mengen koagulablen Eiweißes gefunden. Nachdem diese durch erneutes Aufkochen unter Zusatz von verdünnter Essigsäure ausgefällt und abfiltriert worden waren, verhielt sich das Filtrat gegen Schwefel negativ.

Die Frage, ob das Reduktionsvermögen der Leber durch das Abkochen beeinträchtigt wird, haben wir durch folgende Bestimmungen zu beantworten versucht.

A. 100 g Leberbrei frisch mit 200 ccm physiologischer Kochsalzlösung und 1 ccm Chloroform gemischt, nach vierstündigem Stehen koliert. Zur Kolatur 2 g Schwefel, zum Rückstand 200 ccm Kochsalzlösung und 2 g Schwefel zugefügt. Luftdurchleitung bei 40°.

B. 100 g Leberbrei mit 200 ccm physiologischer Kochsalzlösung gekocht und abfiltriert. Filtrat und Rückstand wie oben behandelt.

Während 1 Stunde wurden gebildet	A. frisch mg H_2S	B. gekocht mg H_2S
im Filtrat	0,38	0,15
im Rückstand	0,30	0,29
Zusammen	0,68	0,44

Aus diesen allerdings nur kurz dauernden Versuchen ergibt sich, daß durch das Abkochen die H_2S-Bildung nicht aufgehoben, sondern nur etwa um ein Drittel verringert wird. Während die extrahierte Lebersubstanz in beiden Versuchen etwa die gleiche Menge H_2S produziert, ist sie in dem abgekochten Extrakt außerordentlich gering. Wenn man den mittleren Versuchsfehler von 0,11 mg H_2S abzieht, so bleiben nur einige Hundertstel Milligramme übrig, die sich allerdings durch Bleipapier noch deutlich nachweisen ließen. Es ist klar, daß diese Verminderung der H_2S Bildung im abgekochten Auszug gegenüber dem frischen Extrakt wesentlich auf der Ausfällung der wirksamen Substanz durch das Kochen beruht.

Aus diesen Beobachtungen dürfen wir besonders nach den am Eierklar gewonnenen Erfahrungen wohl schließen, daß die H_2S-bildende Eigenschaft des Lebergewebes zum größeren Teile durch einen unbekannten eiweißartigen Bestandteil bedingt ist, der auch nach dem Erhitzen auf 100° noch wirksam ist, also nach unseren gegenwärtigen Anschauungen kein Ferment sein kann. Wir möchten aber nicht so weit gehen, wie Abelous und Ribaut und die Mitwirkung von Fermenten bei der H_2S-Bildung durch frische Leber ganz ausschließen. Es ist möglich, ja nach den mitgeteilten Versuchen wahrscheinlich, daß bei den autolytischen Vorgängen eine Reduktion des Schwefels stattfindet, wenn sie auch quantitativ hinter der Wirkung des unbekannten Eiweißkörpers zurücksteht.

V. Das Wesen des Vorganges.

Im Vorstehenden wurde gezeigt, daß das kristallisierte Ovalbumin und vielleicht auch das Konalbumin sowie bisher nicht näher bekannte Eiweißkörper der tierischen Gewebe aus Schwefel bei gewöhnlicher Zimmertemperatur oder 40° H_2S bilden und diese Eigenschaft auch nach dem Kochen nicht eingebüßt haben. Ob die in den Blutzellen vorhandene wirksame Substanz ebenfalls koktostabil ist und mit den wirksamen Bestandteilen der Organe in eine Reihe gehört, konnten wir bisher nicht mit Sicherheit entscheiden.

Die Eigenschaft, Schwefel bei Zimmertemperatur zu H_2S zu reduzieren, kommt durchaus nicht allen Eiweißkörpern zu. Es ist

gezeigt worden, daß den Globulinen des Eierklars und Blutserums, dem Fibrin, dem Serumalbumin, den Eiweißkörpern der Milch und anderer Sekrete diese Fähigkeit abgeht. Durch Pepsinspaltung geht sie dem Ovalbumin und wahrscheinlich auch den anderen aktiven Substanzen verloren. Demgemäß bilden Witte-Pepton und käufliche Hemialbumose keinen H_2S. Inaktiv erweisen sich ferner Gelatine und Hefenuclein. Alle diese Angaben gelten für Versuche bei Zimmertemperatur oder 40°.

Rösing und kürzlich Abelous und Ribaut haben angegeben, daß einige dieser inaktiven Eiweißkörper beim Kochen mit Schwefel H_2S bilden und setzen diesen Vorgang der bei niederer Temperatur verlaufenden Reaktion gleich. Wir halten das nicht für zulässig, weil beim Erhitzen eines Eiweißkörpers mit Wasser und Schwefel auf 100° zwei andere Reaktionen stattfinden können, die mit der oben geschilderten Einwirkung von Schwefel auf Eiweiß nicht identisch sind.

Zunächst wissen wir, daß gewisse Eiweißkörper beim einfachen Kochen mit Wasser schon H_2S abspalten. Längst bekannt ist das für das Keratin. Eierklar spaltet bei mehrstündigem Kochen ganz erhebliche Mengen von H_2S ab [Rubner[14]]. Niemann[16]) hat gezeigt, daß beim Kochen des Fleisches von Fischen, Hummern und Krebsen H_2S abgespalten wird und bei einer Reihe pflanzlicher Nahrungsmittel nicht bloß H_2S, sondern auch Merkaptan entweicht. Es genügt also bei vielen Eiweißkörpern schon die Siedetemperatur, um eine Abspaltung von H_2S zu bewirken, ohne daß ein Zusatz von Schwefel erforderlich ist.

Aber selbst wenn für einen Eiweißkörper festgestellt ist, daß er beim einfachen Erhitzen mit Wasser keinen H_2S abspaltet, so ist die Bildung beim nachherigen Zusatz von Schwefel kein Beweis dafür, daß hierbei der Eiweißkörper beteiligt ist. Denn schon Schwefel allein bildet beim Kochen mit Wasser H_2S. Wasser wird durch Schwefel jeder Art bei seiner Siedetemperatur zerlegt, und kocht man eine gewisse Menge Schwefel mit Wasser, indem man von Zeit zu Zeit das Verdampfte ersetzt, so läuft die H_2S-Bildung ununterbrochen fort. Dieses Verhalten des Schwefels gegen Wasser ist schon längst beschrieben worden, so von Geitner[17]) und später von J. Boehm[18]) und Cross und Higgin[19]). Die Bildung von H_2S beim Kochen von Eiweißkörpern mit Schwefel hat nach diesen Darlegungen wahrscheinlich andere Ursachen, als der in unseren Versuchen beobachtete Vorgang.

Wie läßt sich die auffallende Erscheinung der H_2S-Bildung erklären? Bei Erörterung dieser Frage wollen wir wesentlich die

am Eierklar gewonnenen Erfahrungen berücksichtigen, da hier die Verhältnisse am einfachsten sind. Daß der Vorgang nicht fermentativer Natur ist, geht aus unseren Versuchen und denen von Abelous und Ribaut deutlich hervor und somit erübrigt sich ein Eingehen auf die Philothion-Hypothese de Rey-Pailhades. Nasse und Rösing betrachten den Prozeß als eine Oxydation des Eiweißes, indem sie annehmen, daß es sich durch Aufnahme eines Hydroxyls aus dem Wasser oxydiere. Das Hydroxyl soll an Stelle eines Wasserstoffatoms im Eiweißmolekül treten und dieses H-Atom mit dem restierenden H-Atom des Wassers mit Schwefel H_2S bilden. Als Beispiele dieses Vorganges ziehen Nasse und Rösing die Oxydation von gewissen Aldehyden zu den entsprechenden Säuren heran. In der Tat läßt sich zeigen, daß bei der Autooxydation von Benzaldehyd, Acetaldehyd oder Önanthol in Gegenwart von Schwefel und Wasser H_2S entsteht. Nach Englers[20]) Untersuchungen ist bei diesen Körpern der Prozeß der Autooxydation anders aufzufassen, als Nasse und Rösing sich vorgestellt haben. Ein O-Molekül vereinigt sich unter Austritt des labil gebundenen H mit dem Autooxydator zu Superoxyd. Wir können uns nun denken, daß eine Anzahl der labilen H-Atome, anstatt Wasserstoffperoxyd zu bilden, sich mit dem anwesenden Schwefel zu H_2S vereinigten.

$$2\,C_6H_5C\begin{cases}O\\H\end{cases} + \begin{matrix}O\\ \|\\ O\end{matrix} + S = \begin{matrix}C_6H_5C{=}O\\ \quad\rangle O\\ C_6H_5C{=}O\end{matrix} + H_2S.$$

Bamberger[21]) hat bei der Autooxydation verschiedener Arylhydroxylamine ebenfalls die reduzierende Wirkung der labilen H-Atome beobachtet; es traten neben den Hauptprodukten (Azoxy- bzw. Nitrosoverbindungen) in geringer Menge Arylamine auf. Auffallender Weise war es uns nicht möglich, bei der Autooxydation von Phenylhydroxylamin in Gegenwart von Schwefel H_2S zu erhalten.

Gegen die Ansicht Nasses, den wirksamen Eiweißkörper als einen Autooxydator nach dem Muster des Benzaldehyds und anderer Aldehyde aufzufassen, läßt sich folgendes einwenden. Die H_2S-Bildung verläuft beim Benzaldehyd viel träger, als beim Ovalbumin. Sie tritt nur bei Belichtung auf, während die H_2S-Bildung durch Eiweiß im Dunkeln wie im Sonnenlicht mit gleicher Geschwindigkeit verläuft. Darauf, daß es nicht gelingt, bei der supponierten Autooxydation des Ovalbumins Wasserstoffperoxyd nachzuweisen, wollen wir kein Gewicht legen, da eine Zerstörung desselben

durch die organische Substanz möglich wäre. Wenn indessen der Prozeß nach dem Modell der Autooxydation des Benzaldehyds verliefe, so müßte das Eiweiß im stande sein, einen Acceptor d. h. einen unter sonst gleichen Bedingungen nicht direkt oxydabeln Körper z. B. arsenige Säure oder Indigschwefelsäure zu oxydieren (vgl. Engler a. a. O.) Binz hat schon früher die Unwirksamkeit des Eierklars auf arsenige Säure gezeigt. Wir können sie bestätigen und hinzufügen, daß auch Indigschwefelsäure durch Ovalbumin bei langem Schütteln mit Luft nicht verändert wird. Schließlich spricht auch nicht für die Anschauung Nasses, daß die Anwesenheit von Aldehydgruppen in Eiweißkörpern bisher keineswegs nachgewiesen ist.

Daß es sich bei der Einwirkung von Schwefel auf das Eieralbumin um einen Oxydationsprozeß handelt, wie aus der Aufhebung des Vorganges durch kleine Mengen oxydierender Mittel ersichtlich wird, haben Nasse und Rösing ganz richtig erkannt. Aber muß damit unbedingt eine Aufnahme von Sauerstoff verbunden sein? Kann es sich nicht nur um ein Austreten von Wasserstoffatomen handeln? Die Erfahrung hat gelehrt, daß der Schwefel unter Umständen ein geeignetes Mittel ist, Wasserstoff wegzunehmen. So entsteht beim Erhitzen von Schwefel und Diphenylmethan unter H_2S-Bildung Tetraphenyläthylen (Ziegler[22]).

$$2(C_6H_5)_2CH_2 + 2S = (C_6H_5)_2C:C(C_6H_5)_2 + 2H_2S.$$

Während bei dieser Reaktion hohe Temperaturen erforderlich sind, bewirkt, wie E. Fischer[23]) fand, beim Phenylhydrazin der Schwefel schon bei 80° H-Abspaltung.

$$2\,C_6H_5.NH.NH_2 + S = 2\,C_6H_5NH_2 + H_2S + N_2.$$

Es läßt sich leicht zeigen, daß schon bei Zimmertemperatur diese Reaktion eintritt. Sowohl Phenylhydrazin als auch die wässerige Lösung des Acetats entwickeln mit Schwefel zusammengebracht tagelang kleine Mengen von H_2S, allerdings auch Stickstoff, dessen Aufsteigen in Bläschen namentlich bei Anwendung der freien Base deutlich wahrgenommen werden kann.

Sehr leicht spalten gewisse Thioverbindungen Wasserstoff ab. So oxydieren sich Thiophenol [Hübner und Alsberg[24])], Thiobenzoesäure [Engelhardt[25])] und Benzylmerkaptan [Märcker[24])] schon beim Eindampfen durch den Sauerstoff der Luft, indem sie in Disulfide übergehen, z. B.

$$2\,C_6H_5SH + O = C_6H_5S - SC_6H_5 + H_2O.$$

Sehr leicht scheint diese Wasserstoffabspaltung nach der Angabe von List und Stein[27]) bei der Thiosalizylsäure stattzufinden. Beim Stehen oxydieren sich alle ihre Lösungen rasch durch den Luftsauerstoff und es scheidet sich Dithiosalizylsäure aus.

Wir haben bei einigen dieser Verbindungen geprüft, ob sie sich bei Gegenwart von Schwefel unter Bildung von H_2S oxydieren. Da die Dämpfe dieser Thiokörper nicht selten selbst auf Bleiacetatpapier einwirken, so ist stets eine Kontrollprobe ohne Schwefelzusatz angestellt worden. Die Ergebnisse sind folgende:

	Färbung des Bleipapiers
Benzylmerkaptan in alkohol. Lösung mit S	sehr rasch tiefschwarz
„ „ „ „ ohne „	langsam hellbraun
Thiophenol „ „ „ mit „	sehr rasch tiefschwarz
„ „ „ „ ohne „	bleibend gelb
Thioglykolsäure „ „ „ mit „	rasch tiefschwarz
„ „ „ „ ohne „	sehr langsam braun
Thioglykolsaures Na in wässer. Lösung mit S	langsam tiefschwarz
„ „ „ „ „ ohne „	keine Färbung

Die Versuche haben unsere Erwartung bestätigt und gezeigt, daß der Schwefel auf diese Verbindungen bei gewöhnlicher Temperatur wasserstoffabspaltend wirkt. Durch vorherige Oxydation mit Ferricyankalium wird selbstverständlich die H_2S-Bildung verhindert.

Andere Thioverbindungen, wie die Merkaptane der aliphatischen Reihe haben nicht eine so ausgesprochene Neigung, ihren an Schwefel gebundenen Wasserstoff an den Luftsauerstoff abzugeben. Doch werden sie ebenfalls durch sehr gelinde Oxydationsmittel wie Jod oder Kupfersulfat in Disulfide übergeführt. Wie wir gefunden haben, kann auch hier der Schwefel bei niederer Temperatur die Abspaltung des Wasserstoffs bewirken. Äthylmerkaptan in alkoholischer Lösung oder bei Anwesenheit von Wasser mit Schwefel zusammengebracht bewirkt sofort tiefe Schwärzung eines eingehängten Bleipapiers, während in einer Kontrollösung ohne Schwefel das Bleipapier sich nur zitronengelb färbt und auch nach langem Verweilen nie die tiefschwarze Färbung des anderen Streifens erreicht. Es sei noch bemerkt, daß Abkühlen auf 0° die Reaktion nicht beeinträchtigt.

Auch in anderer Hinsicht bietet das Verhalten dieser Thioverbindungen Analogien zum Ovalbumin. Durch Selen wird ihnen der Wasserstoff ebenfalls nicht entzogen, auch dann nicht, wenn man, wie M. Müller [29]) beim Äthylmerkaptan gefunden hat, auf 150° erhitzt. Ferner wirken sie reduzierend auf Kakodylsäure. Wir haben diese Reaktion nur beim Thiophenol geprüft und sowohl durch den Geruch wie durch die Bräunung eines Silbernitratpapieres die Bildung von Kakodyloxyd feststellen können.

In diesem Verhalten der Merkaptane kann man vielleicht den Schlüssel zum Verständnis der H_2S-Bildung durch Eiweiß und Schwefel sehen. Der Annahme, daß in gewissen Eiweißkörpern Schwefel in merkaptanartiger Bildung enthalten ist, steht nichts entgegen. Im Gegenteil scheint speziell für das Ovalbumin eine Beobachtung Mörners[28]) diese Ansicht zu bestätigen. Mörner fand, daß bei der Hydrolyse dieses Eiweißkörpers ungefähr ein Drittel des Gesamtschwefels in Form einer flüchtigen Verbindung von lauchartigem Geruch abgegeben wurde. Daß sie Bleipapier nicht färbte, spricht noch nicht gegen die Vermutung, es habe ein Merkaptan vorgelegen, denn diese Verbindungen wirken erst bei einer gewissen Konzentration färbend. Die weitere Angabe Mörners, daß Serumalbumin und -globulin wahrscheinlich den gesamten Schwefel in cystinähnlicher Weise enthalten, harmoniert mit dem negativen Verhalten dieser Eiweißkörper gegen Schwefel.

Nach der Analogie mit den Thiokörpern hätten wir uns den Vorgang beim Ovalbumin so vorzustellen, daß unter Abgabe je eines H-Atomes zwei Moleküle unter Bildung eines Disulfid-artigen Körpers zusammentreten würden. Dementsprechend müßten wir auch annehmen, daß bei Einwirkung sehr schwacher Oxydationsmittel wie kleiner Mengen Jod, Ferricyankalium u. a., der gleiche Prozeß stattfände.

Weitere Versuche mit kristallisiertem Ovalbumin, die im hiesigen Institut im Gange sind, werden hoffentlich noch einiges zur Aufklärung beitragen.

Zum Schluß sei darauf hingewiesen, daß durch den Nachweis von Eiweißkörpern mit labilem Wasserstoff gewisse im Organismus sich vollziehende Reduktionsprozesse unserem Verständnis näher gerückt werden. Die Reduktion der Jodate zu Jodiden, des Ferricyankaliums zur Ferroverbindung, die Bildung von Kakodyloxyd aus Kakodylsäure finden ihre Erklärung im Verhalten dieser Eiweißkörper. Was speziell den Schwefel anlangt, so eröffnen die mitgeteilten Versuche eine andere Auffassung seiner Resorption, als die bisher angenommene ist. Hierüber soll an anderer Stelle berichtet werden.

Literaturverzeichnis.

1) A. Heffter, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 46, 230.

2) De Rey-Pailhade, Recherches expérimentales sur le philothion etc. Paris, Masson, 1891. — Nouvelles recherches sur le philothion. Toulouse, Gimet-Pisseau, 1892. — Le philothion et le soufre. Toulouse, Lagarde et

Sebille, 1894. — Le philothion ou hydrogénase. Toulouse, Lagarde et Sebille, 1900.

[3]) H. und E. Buchner und Hahn, Die Zymasegährung. 1903, S. 79 u. 341.

[4]) Pozzi-Escot, Etat actuel de nos connaissances sur les oxydases et les reductases. Paris, Dunod, 1902.

[5]) Rösing, Untersuchungen über die Oxydation von Eiweiß in Gegenwart von Schwefel. Dissertation (unter O. Nasse). Rostock 1891.

[6]) O. Nasse, Naturforschende Gesellschaft zu Rostock. Sitzung v. 31. Oct. 1891.

[7]) Binz und Schulz, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmakol. **11**, 205, 1879.

[8]) Bach und Chodat, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **36**, 1756, 1903.

[9]) Gianuzzi, Virchows Archiv **34**, 443, 1865.

[10]) Magnus-Levy, Diese Beiträge **2**, 261, 1902.

[11]) Cossa, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **1**, 117, 1868.

[12]) Heffter, Arch. f. d. ges. Physiol. **38**, 502, 1886.

[13]) Abelous und Ribaut, Compt. rend. **137**, 95, 1903.

[14]) Rubner, Niemann und Stagnitta-Balestrieri, Archiv f. Hygiene **19**, 136, 1893.

[15]) Raudnitz, Ergebnisse der Physiol. **2**, 1. Abt., 279, 1903.

[16]) Niemann, Arch. f. Hygiene **19**, 126, 1893.

[17]) Geitner, Ann. d. Chem. **129**, 350, 1864.

[18]) J. Boehm, Monatsh. f. Chem. **3**, 224, 1883.

[19]) Cross und Higgin, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **16**, 1195, 1883.

[20]) Engler, ebenda **33**, 1097, 1900.

[21]) Bamberger, ebenda **33**, 113, 1900.

[22]) Ziegler, ebenda **21**, 779, 1888.

[23]) E. Fischer, ebenda **10**, 1334, 1877.

[24]) Hübner und Alsberg, Ann. d. Chem. **156**, 330, 1870.

[25]) Engelhardt, Zeitschr. f. Chem. 1868, 353.

[26]) Märcker, Ann. d. Chem. **136**, 75, 1865.

[27]) List und Stein, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **31**, 1668, 1898.

[28]) K. A. H. Mörner, Ztschr. f. physiol. Chemie **34**, 207, 1901.

[29]) M. Müller, Journ. f. prakt. Chemie (2) **4**, 39, 1871.

XIV.

Untersuchungen über das Harneiweiß.

Von **A. Oswald**, Privatdozent.

Ausgeführt im pharmakologischen Institut und der pädiatrischen Klinik in Zürich.

Über die Herkunft des Harneiweißes gehen die Meinungen der Autoren noch bis in die jüngste Zeit auseinander. Während es nach den einen ausschließlich dem Blute entstammt, glauben andere auf Grund einiger ihm zukommenden Eigenschaften, für einen Teil desselben eine Abstammung vom Nierengewebe annehmen zu müssen. Zu diesen letzteren gehört vor allem Senator*).

Eine Entscheidung dieser schwebenden Frage ist von der genauen chemischen Untersuchung des Harneiweißes in gewisser Beziehung zu erwarten.

Es ist gelungen, die Eiweißkörper des Blutes im Harn nachzuweisen, oder richtiger ausgedrückt, zwei Eiweißkörper, welche, soweit die äußeren Eigenschaften einen Schluß zulassen, mit den Eiweißstoffen des Blutserums, dem Serumglobulin**) und dem Serumalbumin, identifiziert werden dürfen. Es unterliegt aber auch aus anderen Gründen keinem Zweifel, daß diese Körper tatsächlich die beiden Bluteiweißstoffe sind.

Aus der sehr umfangreichen Literatur, die sich besonders in den beiden letzten Dezennien über diesen Gegenstand angehäuft hat, geht jedoch hervor, daß die Verteilung der beiden Eiweißkörper im Harn nicht die gleiche ist, wie im Blut, daß bald der eine, bald der andere vorwiegt, daß es aber ganz bestimmte Umstände sind, unter welchen der eine, andere, unter welchen der

---

*) H. Senator, Die Albuminurie in physiologischer und klinischer Beziehung. Berlin, Hirschwald, 1890.

**) Es soll hier vor der Hand noch die generelle Bezeichnung beibehalten werden.

andere die Oberhand gewinnt. Um die Auffindung dieser, wenn auch bei weitem nicht bis in alle Einzelheiten erkannten Gesetzmäßigkeit, auf die hier weiter nicht eingegangen werden soll, haben sich besonders Strauss*), Csatáry**) und Cloëtta***) Verdienste erworben.

Von Wichtigkeit für die Kenntnis der Nierenkrankheiten und insbesondere die Lehre der Albuminurie sind die Rückschlüsse, die man aus dem Vergleich der pathologisch-anatomischen Veränderungen in den Nieren mit dem Mischungsverhältnis der beiden Harneiweiße gezogen hat, indem sich hieraus Gesichtspunkte eröffnet haben, welche uns das Verständnis der Art der Funktionsstörungen näher rücken.

Von einem dritten im Blutplasma vorkommenden Eiweißstoff, dem Fibrinogen, ist nicht viel bekannt, wenigstens liegen hierüber bis auf die neuesten, weiter unten zu besprechenden Abhandlungen, keine Angaben in der Literatur vor, abgesehen von einigen spärlichen Notizen über das Auftreten von Fibrin im Harn, das bei renaler Albuminurie ein sehr seltenes Vorkommnis ist.

In den letzten Jahren ist vielfach von einem ferneren Eiweißkörper die Rede gewesen, welcher oft in Begleitung der beiden ersterwähnten oder auch nur eines derselben, oder aber auch nicht selten allein im Harn vorkommt, und welchem man, wegen seines Verhaltens gegenüber Säuren, eine Sonderstellung eingeräumt hat, sowohl bezüglich seiner Natur, wie auch ganz besonders seiner Herkunft. Man sprach ihn wegen seiner Fällbarkeit durch Essigsäure als Nucleoalbumin an, indem man fast allgemein der Ansicht war, daß im Harn von den durch Essigsäure fällbaren Eiweißstoffen neben Mucin kein anderer Eiweißkörper als Nucleoalbumin in Betracht käme und Mucin wegen des sonstigen Verhaltens des Eiweißstoffes ausgeschlossen werden konnte. Vor allem stützte sich aber diese Auffassung auf den von Obermeyer†), in dem Essigsäureniederschlag gelieferten Nachweis von Phosphor.

*) J. Strauss, Untersuchungen über den Gehalt des eiweißhaltigen Harns an Serumalbumin, Serumglobulin, Nucleoalbumin und Mucin mit besonderer Berücksichtigung der Frage der Nucleoalbuminurie. Inaug.-Diss. Straßburg 1895.

**) A. Csatáry, Über Globulinurie. Deutsch. Arch. f. klin. Med. 47, 159 (1891).

***) M. Cloëtta, Sur la valeur diagnostique de la globuline dans les urines albumineuses. Arch. génér. de méd. Nov. 1897; — derselbe, Über die Genese der Eiweißkörper bei der Albuminurie. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 42, 453 (1899).

†) F. Obermeyer, Über Nucleoalbuminausscheidung im Harn. Centrbl. f. inn. Med. 13, Nr. 1 (1892).

Die Bezeichnung Nucleoalbumin ist dann von einem Autor zum anderen übergegangen, ohne daß man je zu ermitteln versucht hätte, ob in allen Fällen ein phosphorhaltiger Körper eliminiert wurde. So viel nämlich aus den Untersuchungen Obermeyers hervorgeht, hat dieser nur in dem bei Ikterus erhaltenen Essigsäureniederschlag Phosphor nachgewiesen. Es sagt dies daher nicht, daß bei allen anderen, sogar zahlreichen Erkrankungen, wo Essigsäure im Harn einen Niederschlag erzeugt, dieser immer aus Nucleoalbumin bestehen müsse, da bei Ikterus besondere Umstände obwalten können, die die Ausscheidung eines solchen Körpers mittelbar oder unmittelbar bedingen.

Außer Ikterus ist auch bei Pseudoleukaemie von Jolles*) ein phosphorhaltiger Eiweißkörper aus dem Harn isoliert worden (mit einem Phosphorgehalt von 3.14 Proz.). Doch liegen auch hier ganz bestimmte Verhältnisse vor, die nicht mit anderen Erkrankungen, wie einfache Nephritiden oder sonstige weiter unten zu besprechende Affektionen, in Parallele gezogen werden dürfen, da der Annahme nichts im Wege steht, daß bei diesen Fällen aus den zahlreichen zu Grunde gehenden Leukocyten ein phosphorhaltiger Körper in Freiheit gesetzt wird.

Da man an der Nucleoalbuminnatur des „durch Essigsäure fällbaren Körpers" einmal festhielt, mußte man, um sein Vorkommen zu erklären, sich nach einem Orte umsehen, wo nukleoalbuminhaltiges Gewebe zu Grunde geht, und da eben bei den Nephritiden nichts anderes, hier in Betracht kommendes, nachgewiesen werden konnte, als entzündliche Erscheinungen in den Nieren, so folgerte man naturgemäß auf eine Zerstörung von Nierenepithelien und brachte das vermeintliche Nucleoalbumin in Zusammenhang mit einem Gewebsuntergang in der Niere. Diese Anschauung ist in der Neuzeit von den meisten Autoren vertreten worden. Zu Gunsten derselben sprach die Beobachtung Cloëttas**), daß sich aus den Nieren von mit Aloïn künstlich nephritisch gemachten Kaninchen, nicht aber aus gesunden, mit verdünnter Sodalösung ein durch Essigsäure fällbares Eiweiß extrahieren läßt.

Wenn der Schluß auf eine Zerstörung von Nierengewebe schon für die Lehre der Nierenentzündung ganz besonders weittragend war, so war er es nicht minder für die Fälle, wo in den Nieren pathologisch-anatomische Veränderungen nicht nachweisbar

*) A. Jolles, Über das Auftreten u. d. Nachweis von Nucleohiston im Harn. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 30, 172 (1897).

**) loc. cit.

sind, wie das bei zahlreichen Albuminurien der Fall ist. Es mußte da eine andere Herkunft, d. h. eine anderweitige Gewebsabstoßung angenommen werden. Daraus ergab sich aber die Notwendigkeit des Vorkommens des „Nucleoalbumins“ im Blut. Von einem solchen ist zwar nur wenig Positives berichtet worden. Einige Autoren erwähnen ausdrücklich, daß sie es im Blut Nierenkranker und nephritisch gemachter Tiere vermißt haben*).
Es lag also hier ein Widerspruch vor, der der Aufklärung bedurfte.

Erst vor kurzem ist von Stähelin**) und bald nachher von Joachim***) darauf hingewiesen worden, daß der von den früheren Autoren als Nucleoalbumin aufgefaßte Körper dem Globulin nahe stehen dürfte.

Auf den Mörnerschen Einwand, wonach der durch Essigsäure fällbare Körper möglicherweise nichts anderes sei, als eine Verbindung von Chondroïtinschwefelsäure, bzw. Nucleinsäure oder Gallensäure mit Serumalbumin, brauche ich nicht einzugehen, da er von Stähelin†) schon zurückgewiesen wurde.

Mit Rücksicht auf den soeben geschilderten Sachverhalt habe ich versucht, der Frage der Herkunft des sogen. Nucleoalbumins dadurch näher zu treten, daß ich bei einem Zustande, wo nachweisbar entzündliche Erscheinungen fehlen, den aus dem Harn durch Essigsäure ausfällbaren Eiweißstoff einer genaueren chemischen Untersuchung unterzog, nämlich bei der zyklischen Albuminurie. Es hatte sich mir hierzu die Gelegenheit geboten bei einem Aufenthalte auf der pädiatrischen Klinik in Breslau, wo die erwähnte Affektion nicht gar selten ist. Im Verlaufe meiner Untersuchungen wurde durch immer von neuem sich ergebende Fragen meine Aufmerksamkeit auch auf andere Arten von Albuminurie gelenkt.

Als ich meine Untersuchungen begann, war die oben erwähnte Arbeit von Joachim noch nicht publiziert, und als ich dieselben schon abgeschlossen hatte, erschien eine unter Rostoskis Leitung ausgeführte Arbeit von Matsumoto††), welche z. T. dasselbe

*) Cloëtta, loc. cit.

**) R. Stähelin, Über den durch Essigsäure fällbaren Eiweißkörper der Exsudate und des Urins. Münch. med. Wochenschr. 1902, Nr. 34, 1413.

***) J. Joachim, Über die Eiweißverteilung in menschlichen und tierischen Körperflüssigkeiten. Pflügers Archiv 93, 595 (1903).

†) loc. cit.

††) Matsumoto, Über die durch Essigsäure ausfällbare Eiweißsubstanz in pathologischen Harnen. Deutsch. Arch. f. klin. Med. 75, 398 (1903). Vgl. auch Rostoski, Über den durch Essigsäure ausfällbaren Eiweißkörper in pathologischen Harnen. Sitzungsberichte der Physikal.-medizin. Gesellschaft zu Würzburg 1902. S.-A.

Thema behandelte und im wesentlichen zu den gleichen Resultaten gelangte wie ich. Da die Befunde für die Pathologie des als zyklische Albuminurie bezeichneten Zustandes, sowie für die Lehre von der Albuminurie überhaupt, von Bedeutung sind, so stehe ich nicht an, sie dennoch, wenn auch in verkürzter Form zu veröffentlichen, um so mehr als meine Untersuchungen in etwas anderer Richtung unternommen wurden.

Ich werde meine eigenen Resultate zuerst anführen und nachher auf die Arbeiten der erwähnten Autoren zu sprechen kommen.

Das von mir verarbeitete Material stammte, soweit es sich auf zyklische Albuminurie bezieht, aus der pädiatrischen Klinik in Breslau. Dem Direktor derselben, Herrn Prof. Dr. Czerny, spreche ich für die freundliche Überlassung desselben auch hier meinen besten Dank aus. Auch dem Assistenzarzt der Klinik, Herrn Dr. W. Freund, welcher, durch die gütige Aufnahme einiger Patienten in die Klinik, mir das Sammeln des erforderlichen Quantums Eiweiß ermöglichte, sei es mir gestattet, an dieser Stelle bestens zu danken.

Der Harn rührte ausschließlich von Kindern von etwa 8 bis 12 Jahren her, welche die Erscheinung der zyklischen Albuminurie in typischer Weise darboten.

Der Zyklus war meistens der Art, daß sich morgens gegen 10 Uhr Eiweißausscheidung einstellte, die allmählich an Intensität zunahm, zwischen 12 und 2 Uhr nachmittags ihr Maximum erreichte, dann allmählich bis zum Abend wieder sank oder abends zwischen 6 und 8 Uhr nochmals ein Maximum erreichte. Im allgemeinen waren die reichlicheren Harnportionen — der Harn wurde in regelmäßigen zweistündlichen Intervallen gesammelt — eiweißärmer als die spärlicheren, entsprechend den Befunden Edels*), doch habe ich hierüber keine genauen quantitativen Bestimmungen angestellt, da es mir nicht auf die Prüfung dieser Verhältnisse ankam. Ebenso war meistens die Eiweißausscheidung in dem auf eine Mahlzeit folgenden Zeitabschnitt am geringsten.

Die eiweißhaltigen Portionen, welche, im unverdünnten Zustande, auf Zusatz von Essigsäure eine deutliche, flockige Fällung gaben, die nach dem Zufügen von Ferrocyankalium noch zunahm, wurden alsbald nach ihrer Entleerung mit Ammonsulfat gesättigt und der Niederschlag abfiltriert. Die Niederschläge wurden alle gesammelt und in mit Ammonsulfat gesättigtem Wasser aufbewahrt. Aus äußeren Gründen wurde die chemische Untersuchung erst mehrere Monate später vorgenommen.

---

*) P. Edel, „Zyklische" Albuminurie und neue Gesichtspunkte für die Bekämpfung von Albuminurien. Münch. med. Wochenschr. 1901, Nr. 46 u. 47, S. 1833 u. 1884.

Nach dieser Zeit löste sich der weitaus größte Teil des Niederschlags wieder auf Wasserzusatz, nur ein geringer Teil blieb unlöslich, löste sich dagegen in verdünnter Sodalösung. Es sei gleich hier bemerkt, daß dieser Teil in seinem sonstigen Verhalten von dem in Lösung gegangenen nicht abwich.

Die neutrale wässerige Lösung des wasserlöslichen Anteils wurde mit Ammonsulfat bis zur Sättigung versetzt und die Eiweißkörper behufs Reinigung mehrere Male umgefällt und mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen. Der Niederschlag nahm jedoch nie eine ganz weiße Farbe an, sondern blieb selbst nach 6- und noch mehrmaliger Fällung grau, wie das bei dem aus Harn gefällten Eiweiß stets der Fall ist.

Alsdann wurde zur Isolierung der einzelnen im Eiweißniederschlag vorhandenen Eiweißportionen geschritten. Zuerst wurden in bekannter Weise die Fällungsgrenzen des Gesamtglobulins und des Albumins bestimmt. Dieselben stimmten mit jenen des Serumglobulins und Serumalbumins überein. Die Fällungsgrenzen des Globulins lagen zwischen 28 und 46 Proz. Volumsättigung mit gesättigter Ammonsulfatlösung, die des Albumins zwischen 54 und 62 Proz. Durch Halbsättigung wurde daher das Albumin von der Globulinfraktion getrennt, wobei sich herausstellte, daß das Albumin etwa die doppelte Menge des Globulins ausmachte.

Die Auflösung des salzfrei gemachten Albumins gab auf Zusatz von wenig verdünnter Essigsäure keine Trübung, während in der Auflösung des salzfreien Globulins der Zusatz von wenigen Tropfen verdünnter Essigsäure einen flockigen Niederschlag hervorrief. Der gesuchte Körper fand sich somit ausschließlich in der letzteren Fraktion.

Da das Serumglobulin, wie Spiro, Haake*) und E. P. Pick**) und später Joachim und Freund***) gezeigt haben, sich in mehrere Fraktionen zerlegen läßt, so versuchte ich durch entsprechenden Zusatz von Ammonsulfat zu der (durch Dialyse) salzfrei gemachten Auflösung des Globulinanteils das Globulin zu zergliedern. Ich hielt mich dabei an die von Pick bestimmten Fällungsgrenzen. Bei der gleichen Gelegenheit wurde auch auf allfällig vorhandenes Fibrinogen [nach Reye†)] gefahndet.

---

*) siehe E. Fuld und K. Spiro, Über die labende und labhemmende Wirkung des Blutes. Zeitschr. f. physiol. Chemie 31, 140 (1901).

**) E. P. Pick, Zur Kenntnis der Immunkörper. I. Mittlg. Diese Beiträge 1, 351 (1901).

***) E. Freund und J. Joachim, Zur Kenntnis der Serumglobuline. Ebenda 36, 407 (1902).

†) W. Reye, Über Nachweis u. Bestimmung des Fibrinogens. Inaug.-Diss. Straßburg 1898.

Es ergab sich, daß bei einer Konzentration entsprechend einer 28proz. Volumsättigung mit Ammonsulfatlösung nur ein geringer Niederschlag ausfiel, somit nur wenig Fibrinogen (bzw. Fibrinoglobulin) vorhanden war. Die bei 36 Proz. Sättigung ausfallende Fraktion, dem Euglobulin entsprechend, war dagegen sehr reichlich vertreten, und etwas geringer als diese erwies sich die bei 46 Proz. Sättigung ausfallende Pseudoglobulinfraktion.

Der größte Teil entfiel somit auf das Euglobulin. Von allen Fraktionen zeigte diese allein die Fähigkeit, durch verdünnte Essigsäure gefällt zu werden. Es unterlag somit keinem Zweifel, daß das Euglobulin den gesuchten Körper darstellte.

Um in ihm ein Nucleoalbumin auszuschließen, wurde mit der etwa 0,2 g wiegenden Menge des Präparates eine Phosphorbestimmung ausgeführt. Es ergaben sich darin nicht wägbare Spuren von Phosphor (mit molybdänsaurem Ammon nachgewiesen), die wohl von einer Verunreinigung mit dem von Freund und Joachim*) im Blutserum unterschiedenen „Nucleoglobulin" herrühren dürften. Dieses fällt zumeist mit dem Euglobulin aus, kann sich jedoch zum Teil auch in der Pseudoglobulinfraktion finden, die daher öfter, nach Spiro, Pick und Joachim Phosphor enthält. Bei der Veraschung des aus dem Harn gewonnenen Pseudoglobulins fand ich auch dieses, wenn auch nur wenig phosphorhaltig. Eine quantitative Bestimmung wurde nicht ausgeführt.

Wenn somit dargetan war, daß das Euglobulin den in Frage stehenden Eiweißkörper darstellte, so mußte der mögliche Einwand behoben werden, daß, wenn auch von den einzelnen, von einander getrennten Eiweißfraktionen nur das Euglobulin durch Essigsäure fällbar war, im unveränderten Harn, in Gegenwart der Harnsalze und unter dem gegenseitigen Einfluß der verschiedenen Eiweißstoffe, vielleicht die Ausfällbarkeit durch verdünnte Säuren sich anders gestalten würde, und eine andere Fraktion des Harneiweißes zur Ausscheidung käme, bzw. bei der Niederschlagsbildung mitgerissen würde. Zu dem Zweck wurde, da mir ein Fall von zyklischer Albuminurie nicht zu Gebote stand, Harn, der von einer frischen Scharlachnephritis herrührte und welcher auf Zusatz von Essigsäure eine starke Trübung zeigte, mit diesem Reagens versetzt. Der sich zu Flocken zusammenballende Niederschlag wurde abfiltriert, mit ganz leicht angesäuertem Wasser gewaschen und

*) loc. cit.

dann in schwach alkalischem Wasser gelöst. Durch steigenden Zusatz von gesättigter Ammonsulfatlösung wurde versucht, aus der neutralisierten Lösung die verschiedenen Eiweißfraktionen zu isolieren. Es ergab sich jedoch, daß nur bei dem für Fibrinogen (Fibrinoglobulin) und Euglobulin charakteristischen Gehalt an Ammonsulfat sich ein Niederschlag bildete, während bei einem der Ausfällung der Pseudoglobulinfraktion entsprechenden Sättigungsgrad die Lösung bloß etwas opaleszent wurde.

Dadurch war erwiesen, daß auch bei Nephritis der durch Essigsäure hervorgerufene Eiweißniederschlag aus Euglobulin und Fibrinogen (oder Fibrinoglobulin) bestand.

Um diesen Befund auf seine Allgemeinheit zu prüfen, habe ich mehrere von Scharlachnephritis herrührende Harne in der gleichen Weise untersucht — meine Beobachtungen erstrecken sich auf ein Dutzend Fälle — und dabei ausnahmslos gefunden, daß dort, wo Essigsäure einen Niederschlag erzeugt, auch die Fibrinogen-Euglobulinfraktion vertreten war, während dort, wo kein Niederschlag entstand, Euglobulin und Fibrinogen fehlten. Dabei konnte ich die von Cloëtta*) an Kaninchen gemachte Beobachtung bestätigen, daß der Essigsäureniederschlag vorzugsweise im Anfangsstadium der akuten Nephritis, aber nur selten, und dann in viel geringerer Menge, bei vorgeschrittenen Prozessen zu beobachten ist. Eine Ausnahme hiervon scheint nach den Untersuchungen Joachims**) und Wallersteins***) die Amyloidnephritis zu bilden, bei welcher Fibrinogen und Euglobulin stets in merklicher, und sogar ganz erheblicher Menge nachweisbar sind.

Überblicken wir die mitgeteilten Resultate, so ersehen wir daraus, daß die bisherige Annahme, es sei sowohl bei zyklischer Albuminurie, als auch bei Nephritis der durch Essigsäure erhältliche Niederschlag ein Nucleoalbumin, nicht zutrifft. Nach dem Phosphorgehalt zu schließen, kann es sich höchstens um ganz minimale Mengen eines solchen Körpers handeln. Weitaus die Hauptmasse des Niederschlags besteht aus Euglobulin, ein geringerer Teil aus Fibrinogen bzw. Fibrinoglobulin.

Diese Befunde entsprechen, wie man sieht, den von Matsumoto und Joachim†) bei Nephritis, von ersterem auch bei zyklischer Albuminurie gemachten Beobachtungen, welche in

*) loc. cit.

**) loc. cit.

***) S. Wallerstein, Quantitative Bestimmung der Globuline im Blutserum und in anderen tierischen Flüssigkeiten. Inaug.-Diss. Straßburg 1902.

†) loc. cit.

gleicher Weise ergaben, daß das vermeintliche Nucleoalbumin ein Gemenge der eben genannten Eiweißkörper darstellt.

Um auf die eingangs gestellte Frage zurückzukommen, welche mich zu diesen Untersuchungen veranlaßt hat, so deutet also der durch Essigsäure erhältliche Niederschlag nicht auf eine Zerstörung von Gewebszellen und, wie man annahm, auf einen Schwund von Nierengewebe hin. Es handelt sich lediglich um die Ausscheidung von Bluteiweißstoffen.

Warum mit dem Serumalbumin und dem Pseudoglobulin nicht immer Euglobulin bzw. Fibrinogen ausgeschieden wird, sondern nur unter bestimmten Bedingungen, werde ich an anderer Stelle näher besprechen.

Die Frage, warum das Euglobulin durch Essigsäure im Harn so leicht, im Blutserum dagegen nicht gefällt wird, eine Erscheinung, welche viele Autoren irregeführt hat, indem sie glaubten, im Harn einen Körper vor sich zu haben, der im Blutserum nicht existiert, ist kürzlich von Matsumoto*) dahin beantwortet worden, daß es im Blut wesentlich der Salzmangel ist, der das Ausfällen des Euglobulins und Fibrinogens durch Essigsäure verhindert. Fügt man zum Blutserum etwas Chlornatrium oder normalen Harn, so erzeugt Essigsäure eine Fällung, welche sich von dem Essigsäureniederschlag im Harn nicht unterscheidet.

Um zu erfahren, ob die Albuminfraktion, trotzdem sie keinen Niederschlag auf Essigsäurezusatz ausfallen ließ, Phosphor enthält, wurde dieselbe hierauf untersucht. Es ergab sich in der Tat ein geringer Phosphorgehalt. Dieser betrug aber bloß 0,02 Proz.**). Diese Beobachtung verdient im Hinblick auf die vor kurzem mitgeteilten Befunde Rostoskis und Matsumotos***) hervorgehoben zu werden.

Diese Autoren beobachteten im Essigsäureniederschlag des Harns, — die Untersuchungen erstreckten sich auf Patienten mit verschiedenen Affektionen — neben dem Fibrinoglobulin und Euglobulin, zuweilen, nicht immer, in sehr geringer oder minimaler Menge einen phosphorhaltigen Eiweißkörper. Dieser Körper, den sie als Nucleoalbumin ansehen, besitzt aber nach den Autoren sehr niedrige Fällungsgrenzen dem Ammonsulfat gegenüber, nämlich von 2 oder 6 bis 20 Proz. Volumsättigung, und scheint identisch zu sein mit dem direkt aus der Niere mit verdünntem Alkali extrahierbaren Nucleoalbumin. Der von mir (in der Albumin-

*) loc. cit.

**) 0,4440 g Substanz gaben 0,00049 g $Mg_2P_2O_7 = 0{,}02$ Proz. P.

***) loc. cit.

fraktion) gefundene, phosphorhaltige Körper ist somit nicht identisch mit diesem*).

Eine Verunreinigung mit Phosphaten aus dem Harn, an die gedacht werden muß, kann mit ziemlicher Sicherheit ausgeschlossen werden, da die Eiweißfraktion sechsmal mit Ammonsulfat ausgefällt, jedesmal mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen und zuletzt gegen fließendes und später gegen destilliertes Wasser, bis zum vollständigen Verschwinden der Schwefelsäurereaktion im Dialysat, dialysiert worden ist.

Um mich zu überzeugen, ob auch die Albuminfraktion bei Nephritis phosphorhaltig ist, untersuchte ich ein Präparat, das von einer Scharlachnephritis herrührte. Dasselbe erwies sich als gänzlich phosphorfrei.

Um mich ferner zu überzeugen, ob menschliches Serum in der Albuminfraktion Phosphor enthalten kann, habe ich die Albuminfraktion einer Ascitesflüssigkeit untersucht. Diese Flüssigkeit ist zwar nicht gleichbedeutend mit Blutserum, stand mir aber in der erforderlichen Menge zur Verfügung, während ein hinreichendes Quantum Serum nicht zu beschaffen war. Ich fand in einem Fall von ganz klarem Ascites in der Tat Phosphor in der Albuminfraktion, allerdings auch nur in sehr geringer Menge, nämlich zu 0,06 Proz.**). In einem anderen Fall war kein Phosphor nachweisbar. Der Phosphor scheint also auch an eine andere Fraktion, nicht nur an Euglobulin gebunden vorzukommen. Das Serumalbumin vom Hund fand ich phosphorfrei.

Wie der, wenn auch sehr geringe, Phosphorgehalt der Serumalbuminfraktion zu erklären ist, vermag ich nicht zu sagen. Die Frage bleibt unentschieden, ob mit dem Serumalbumin der Patienten, von welchen der Harn herrührte, Phosphor, d. h. ein Nucleoalbumin gefällt wurde, oder ob sich an das Albumin ein phosphorhaltiger Körper (Lecithin) angelagert hat, oder aber ob die phosphorhaltigen Bestandteile von der Niere bzw. den Harnwegen geliefert wurden. Jedenfalls dürfte es sich, mit Rücksicht auf den sehr niedrigen Phosphorgehalt, nur um eine geringe Beimengung eines Nucleoalbumins bzw. andersartigen, phosphorhaltigen Körpers handeln.

Aus dem wässerigen Extrakt menschlicher Nieren, die von Patienten herrührten, welche mit gesunden Nieren gestorben waren, konnte ich nach Entfernung der Globuline durch Sättigen mit Ammonsulfat ein Albumin darstellen, welches sich als

*) Erwähnen will ich, daß ich das Nucleoalbumin Matsumotos bei zyklischer Albuminurie nicht gefunden habe, da die Lösung erst jenseits von 20 Proz. Volumsättigung sich zu trüben anfing.

**) 0,6349 g Substanz gaben 0,0022 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,068 Proz. P.

phosphorhaltig erwies. Der Phosphorgehalt dieses Körpers belief sich auf 0,19 Proz.*). Neben dem nach Matsumoto fällbaren Nucleoalbumin kommt also ein zweiter phosphorhaltiger Eiweißkörper in der Niere vor, der erst bei höherem Salzgehalt der wässerigen Lösung ausfällt. Ob zwischen diesem und dem phosphorhaltigen Körper der Albuminfraktion des Harns Beziehungen bestehen, ist schwer zu sagen.

Ich möchte nicht versäumen, auch an dieser Stelle dem Direktor des pharmakologischen Instituts, Herrn Prof. Cloëtta, und dem Direktor des Kinderspitals, Herrn Dr. W. v. Muralt, sowie Herrn Prof. Wyss und Herrn Dr. H. O. Wyss meinen Dank auszusprechen für die Liberalität, mit welcher diese Herren mir die Räumlichkeiten und die Materialien ihrer Institute zur Verfügung stellten.

*) 0,2883 g Substanz gaben 0,00289 g $Mg_2P_2O_7 = 0,19$ Proz. P.

XV.

Untersuchungen über das Verhalten der Leberzellen in physikalisch-chemischer Beziehung.

Von **Dr. Eugen Petry**, klinischem Assistenten.

Aus der medizinischen Klinik zu Graz.

Das Verhalten der Kohlensäure gegen die Elemente des Blutes und die Aufteilung derselben auf letztere sind eigenartig und bereiten dem Verständnisse gewisse Schwierigkeiten. Wie Professor Kraus*) gezeigt hat, entfällt bei Behandlung des nativen Blutes mit Kohlensäure auf die Erythrocyten eine weit geringere Menge Kohlensäure als auf das Serum, während Cruor, für sich allein mit Kohlensäure behandelt, mehr davon aufzunehmen vermag, als das Serum.

In inniger Beziehung zu diesem auffälligen Verhalten steht die von Hamburger**) und Limbeck***) studierte Wanderung von Chlor aus dem Serum in die Erythrocytensubstanz unter dem Einflusse der Kohlensäurebehandlung. Es waren von einer eingehenderen Untersuchung des letzteren Vorganges Aufschlüsse über die Ursache der auffälligen Verteilung der Kohlensäure zu erwarten und von diesem Gesichtspunkte aus veranlaßte mich Herr Professor Kraus, die Bedingungen, unter welchen diese Chlorwanderung zustande kommt, näher zu ermitteln. In einer in diesen Beiträgen†) erschienenen Untersuchung konnte ich als das Ergebnis der einschlägigen Versuche mitteilen, daß es nicht gelungen war, durch Zufügung von Schwefelsäure, Milchsäure zum Blute eine ähnliche Änderung in der Chlorverteilung wie durch Kohlensäure zu erzeugen, daß hingegen von zugesetzter Salzsäure ein großer Teil in die Blutkörperchen wandert.

---

*) Über die Verteilung der Kohlensäure im Blute. Festschrift. Graz 1901.

**) Osmotischer Druck u. Ionenlehre. Wiesbaden 1902.

***) Archiv f. exper. Path. 35, 309.

†) Diese Beiträge 3, 247.

Danach erscheint die Fähigkeit der Kohlensäure, Salzsäure in die Erythrocyten hinein zu verdrängen, als etwas ihr spezifisch eigentümliches. Dieses Verhalten gewinnt durch die erst-erwähnten, von Kraus über die Verteilung der Kohlensäure im Blute ermittelten Tatsachen an Bedeutung. Beide Reihen von Erscheinungen ließen sich am ungezwungensten vereinigen, wenn man annimmt, daß die Fähigkeit, in die Erythrocytensubstanz einzudringen, für die Kohlensäure in viel geringerem Maße vorhanden ist, als für Salzsäure, Schwefelsäure und Milchsäure. Betreffs der Ursache dieses abweichenden Verhaltens der Kohlensäure lag es am nächsten, anzunehmen, es sei der Ausdruck der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Säuren als solcher und es müßte sonach Chlorwanderung überall dort auftreten, wo kohlensäurehaltige Kochsalzlösung mit nicht diffusiblen Alkalien durch eine Membran in Austausch tritt. In der Tat hat es nicht an Versuchen gefehlt, die Chlorwanderung und verwandte Phänomene (Salzsäuresekretion) auf Massenwirkung und Verschiedenheiten in der Wanderungsgeschwindigkeit der verschiedenen Säureionen zurückzuführen [Gürber*), Koeppe**)].

War diese Auffassung richtig, so mußte eine solche Chlorwanderung auch bei der Berührung anderer tierischer Zellen, welche ja nichtdiffusibles Alkali eingeschlossen enthalten, mit kohlensäuregesättigter NaCl-Lösung zu erhalten sein. Ich versuchte daher in Fortsetzung der genannten Untersuchung, die erwähnte Auffassung einer experimentellen Prüfung zu unterziehen, indem ich das Verhalten einer anderen Zellart, nämlich der Leberzellen gegen Neutralsalz-Säuregemische, sowie gegen mit Säure versetztes Blut studierte. Im Anschluß daran zog ich auch das Verhalten der Leberzellen gegen andere, bei den Erythrocyten in ihren Wirkungen wohlcharakterisierte Agenzien in den Kreis der Betrachtungen.

I. Methodik.

Bei den vorliegenden Versuchen mußte das Lebergewebe von den Blutgefäßen aus mit den zu untersuchenden Lösungen in Berührung gebracht, und die Lösungen hinterher der chemischen Analyse zugeführt werden. Ich arbeitete mir in Vorversuchen eine zweckdienliche Methode aus, welche gestattete, selbst

*) Sitzungsberichte der mediz.-physik. Gesellschaft. Würzburg 1895.

**) Archiv f. Anatomie u. Physiologie 1895, S. 154 und Pflügers Archiv 67, 189.

kleinere, durch die Berührung mit dem überlebenden Gewebe auftretende Konzentrationsänderungen noch wahrzunehmen.

Die Durchspülung der Leber geschah von der Vena portae aus; die anatomisch-technische Anordnung der Versuche war die gleiche, wie sie Zaleski*) bereits zum Zwecke der Reinigung der Leber von dem in den Gefäßen enthaltenen Blute gelegentlich einer Arbeit über den Eisengehalt der Leber durchführte.

Vorversuche hatten nämlich ergeben, daß eine Durchspülung des herausgeschnittenen Organs beim Kaninchen mit Rücksicht auf die mehrfachen Venae hepaticae, welche sich zum Teil in dem die Leber durchsetzenden Stücke der Cava inferior in letztere ergießen, unmöglich war, und daher mußte die in situ befindliche Leber von der Vena portae aus durchspült und die ablaufende Flüssigkeit von der Cava aus oberhalb des Zwerchfells aufgefangen werden. Eine unmittelbar oberhalb der Einmündung der rechten Nierenvene angelegte Ligatur der Cava verhinderte den Rückfluß der Spülflüssigkeit nach abwärts in das Wurzelgebiet der Cava.

Die Aufsuchung der Vena portae selbst erfolgte anfangs an der Porta hepatis selbst nach Abgang des für den rechten Lappen bestimmten Zweiges, sodaß dieser kleine, vollkommen isolierte Lappen bei den anfänglichen Versuchen nicht mit durchgespült wurde. Später suchte ich den Stamm der Vena portae selbst in der Wurzel des Mesenteriums auf und fand ihn von der nach rechts zu gewendeten Seite des Mesenteriums am leichtesten zugänglich.

Der Vorgang war demnach folgender: Das in tiefer Morphiumäthernarkose befindliche Tier wurde aufgebunden, die Bauchhöhle durch einen ausgiebigen Kreuzschnitt eröffnet, der Darm samt Mesenterium nach links gedrängt, um die Vena cava zugänglich zu machen, dieselbe unterhalb ihres Eintritts in die Leber frei präpariert, ein Unterbindungshaken von innen nach außen unter ihr durchgeführt, die Vene ligiert, sodann durch Anspannen der Rad. mesenterii die Vena portae zugänglich gemacht und zunächst, um profuse Blutungen zu vermeiden, ziemlich tief unten ligiert, weiter proximal davon eine feine Glaskanüle eingebunden und durch dieselbe unter Vermeidung von Lufteintritt die verwendete Spülflüssigkeit (s. u.) zunächst tropfenweise einfließen gelassen. Der Akt der Venenunterbindung sowie die Einführung der Kanüle erfordert besonders tiefe Narkose, da sonst etwas tiefere Atemzüge durch Verlagerung des Operationsfeldes den Versuch vereiteln können.

Sodann wird der Thorax nach Art der Sektionsschnitte eröffnet, die vordere Wand abgetragen und die Vena cava inferior freipräpariert und in dieselbe eine Kanüle mit der Spitze gegen

*) Zeitschr. f. physiolog. Chemie 10, 453.

die Leber zu gerichtet eingeführt; ein daran befestigter Schlauch leitet die ablaufende Flüssigkeit nach außen.

Als Druckhöhe wurde stets eine Entfernung von etwa 40 cm angewendet. Die auslaufende Flüssigkeit wurde anfangs abfließen gelassen, bis sie ziemlich blutfrei war und dann wurde durch Anlegung einer Hofmann-Klemme der Abfluß bis zu tropfenweisem Sickern geregelt, während die Druckhöhe gleich belassen wurde.

Bei gelungenen Versuchen konnte man dann ein pralles Anschwellen der Leber beobachten und die Flüssigkeit floß bereits nach 150 bis 300 ccm Spülflüssigkeit klar und fast wasserhell, nur leicht gelblich gefärbt ab. Im gleichen Maße nahm die Leber einen hell gelbbraunen oder auch lehmartigen Farbenton an.

Die angewandte Methode bietet vielfach Anlaß zum Mißlingen der Versuche; abgesehen von rein operativem Fehlschlagen (besonders nach ausgiebigen Blutungen in die Bauchhöhle durch Verletzung größerer Äste der Vena portae) können Thrombosen des Stammes oder einzelner Äste der Vena portae, Leberrisse und Undichtigkeiten der Kanüleneinbindung den Versuch vereiteln. Letzterer Fall hat besonders bei der Vena cava Bedeutung, wenn in der Brusthöhle Blut angesammelt ist, und dieses mit dem Strom der durchgeschickten Lösung mitaspiriert wird.

Die Temperatur der aus einer Flasche mittels Heberwirkung einfließenden Flüssigkeiten betrug stets 38 bis 40°.

Es galt nun, mit Hilfe dieser Versuchsanordnung die zu untersuchenden Lösungen nur mit den Gefäßwänden in Berührung zu bringen, ein Zusammentreffen mit Blutkörperchen aber tunlichst zu vermeiden. Zu diesem Zwecke wusch ich in Vorversuchen die Leber mit einem raschen Strom der zu prüfenden Lösung blutfrei und verengte nunmehr das Lumen des Abflußschlauches. Da ich jedoch dabei stets nur sehr kleine Konzentrationsänderungen erhielt, so spülte ich nunmehr die Leber zuerst mit einer indifferenten isotonischen Lösung, von der Vorversuche ergeben hatten, daß sie die Lebergefäße unverändert passiert, durch und sandte erst später die auf ihr Verhalten zu prüfende Lösung nach. Mit Hilfe einer einfachen Berechnung konnte ich sodann ermitteln, welche Konzentrationsänderung die durchgetretene Lösung erfahren hatte.

Es sei z. B. zum Entfernen des Blutes aus den Gefäßen eine Lösung der indifferenten Substanz **A**, welche **a** g in 100 ccm enthält, von der zu untersuchenden Substanz **B** sodann eine Lösung von **b** g auf 100 ccm benutzt worden. Die gemischte Spülflüssigkeit enthält nun α Proz. A und β Proz. von der Substanz B.

Da die erstverwandte indifferente Lösung unverändert die Gefäße passiert, so läßt sich aus dem Werte α (Gehalt der gemischten Spülflüssigkeit an der Substanz A) der volumetrische Anteil, den die Lösung von **A** an der gemischten Spülflüssigkeit nimmt, berechnen. Da **a** g

von A 100 ccm der erstverwandten Lösung von A entsprechen, so muß α g $\frac{\alpha}{a} \cdot 100$ ccm Lösung entsprechen. Die α g Substanz enthaltenden 100 ccm der gemischten Spülflüssigkeit bestehen sonach zu $\frac{\alpha}{a} \cdot 100$ ccm aus der Lösung von A. Es entfallen sonach auf den Anteil der Lösung von B. $(100 - \frac{\alpha}{a} \cdot 100)$ ccm $= 100 \cdot \frac{a - \alpha}{a}$ ccm. Daraus läßt sich der Wert für den Gehalt der gemischten Spülflüssigkeit an B berechnen, der zu erwarten wäre, wenn die Lösung von B keine Konzentrationsänderungen erfahren würde. Da nämlich 100 ccm der Lösung von B b g Substanz enthalten, so müssen $100 \frac{a - \alpha}{a}$ ccm eine Menge von $100 \cdot \frac{b}{a} (a - \alpha)$ g von B enthalten. Dieser Wert entspricht somit dem theoretisch erwarteten maximalen Prozentgehalt der gemischten Spülflüssigkeit an B. Die Differenz zwischen demselben und dem tatsächlich gefundenen Prozentgehalt β entspricht der Konzentrationsänderung bezogen auf 100 ccm gemischte Spülflüssigkeit (C)

$$C = \frac{100\,b\,(a - \alpha)}{a} - \beta$$

Aus dem Volum der gesamten gemischten Spülflüssigkeit und dem Werte C kann man also ermitteln, wieviel die Leber im ganzen aus der durchströmenden Lösung an Substanz B in sich aufgenommen hat.

Wenn bei den nachfolgenden Versuchen vom Verhalten der „Leberzellen" schlechtweg gesprochen wird, so bin ich mir wohl bewußt, daß bei dieser Anordnung von einer direkten Berührung der Leberzelle mit der Flüssigkeit nicht die Rede sein kann, daß also die gewonnenen Resultate sich stets nur auf das System „Gefäßwand + Leberzelle" beziehen. Für die Fragestellung war dies ohne Bedeutung, da es ja nur auf das Vorhandensein einer von Außenschichten eingeschlossenen Menge von teilweise an Zelleiweiß gebundenem Alkali ankam, und das System physiologisch ja den Erythrocyten als gleichwertig zu bezeichnen ist. Die abgekürzte Ausdrucksweise mag ferner noch durch das ziemlich indifferente Verhalten (Hamburger*) der Gefäßwände selbst entschuldigt werden, welches gewiß die Eigenart der Gewebszellen als das beim Verhalten gegen zugeführte Stoffe ausschlaggebende Moment erscheinen läßt.

II. Versuche mit neutralen Lösungen.

Zunächst wurden in mehreren Versuchen isotonische oder leicht hypotonische Lösungen von Chlornatrium und Natriumsulfat auf ihr Verhalten gegen das Gewebe geprüft; nachstehende Tabelle

*) Archiv f. Anatomie u. Physiologie 1895.

enthält die Ergebnisse der Versuche, die in der Art angestellt wurden, daß die Leber von der Vena portae aus mit diesen Lösungen durchspült wurde, bis das Organ nach mehrmaligem Stauen lehmfarben, homogen und das Spülwasser farblos und klar war. Es sei bemerkt, daß die Lösungen nach Passieren der Lebergefäße stets ebenso wie vorher neutrale Reaktion gegen Lackmuspapier zeigten; die Natriumsulfatlösungen erwiesen sich nach dem Passieren der Leber als chlorfrei. Tabelle I gibt die Versuchsresultate wieder, welche durch Analyse der einfließenden Lösungen und der klaren Spülflüssigkeiten erhalten wurden.

Tabelle I (Versuche I bis IV).

Versuch	Stammlösung	Spülflüssigkeit
I. Isoton. NaCl-Lösung	1,13 Proz. NaCl 1,13 „ „	1,13 Proz. NaCl 1,12 „ „
II. Hypoton. NaCl-Lösung	0,88 Proz. NaCl 0,885 „ „	0,88 Proz. NaCl 0,90 „ „
III. Hypoton. NaCl-Lösung	0,88 Proz. NaCl 0,88 „ „	0,88 Proz. NaCl 0,88 „ „
IV. Isoton. Na_2SO_4-Lösung	1,593 Proz. H_2SO_4 1,585 „ „	1,587 Proz. H_2SO_4

Die Chlorbestimmungen wurden nach Arnold, die Schwefelbestimmungen durch Wägung als Baryumsulfat ausgeführt.

Wie man sieht, fallen die höchst geringfügigen Differenzen zwischen den Konzentrationen von verwendeter Lösung und Spülwasser weitaus innerhalb der Fehlergrenzen und es läßt sich somit auch bei den leicht hypotonischen Lösungen kein wesentlicher Einfluß des Lebergewebes auf die Konzentration derselben nachweisen.

Im Vergleiche dazu war es interessant, festzustellen, wie sich das Lebergewebe gegen stärker anisotonische Lösungen verhält. Hierfür wählte ich stark hypertonische ($\triangle = 1,2575$) Kochsalzlösung, und beschickte mit derselben eine vorher mit isotonischer Natriumsulfatlösung rein gespülte Leber. Aus der Konzentration der gemischten Spülflüssigkeit an Cl und SO_4 beurteilte ich das Verhalten der Leberzellen gegen die hypertonische Lösung*). Die Resultate sind auf Tabelle II und III verzeichnet.

*) Im Verlaufe der beiden Versuche traten an der Oberfläche der Leber Nerkosen ähnlich den auf S. 11 beschriebenen Säurenekrosen auf, welche sich von letzteren jedoch durch ihre schmutziggraue Farbe unterschieden.

Tabelle II (Versuch V).

	Isoton. Na_2SO_4-Lösung	Hyperton. NaCl-Lösung	Spülflüssigkeit
Proz. NaCl	—	2,105 Proz. 2,09 „	1,785 Proz. 1,79 „
Proz. H_2SO_4	0,895 Proz. 0,895 „	—	0,154 Proz. 0,151 „

Tabelle III (Versuch VI).

	Isoton. Na_2SO_4-Lösung	Hyperton. NaCl-Lösung	Spülflüssigkeit
Proz. NaCl	—	1,85 Proz.	1,53 Proz. 1,51 „
Proz. H_2SO_4	1,533 Proz.	—	0,273 Proz.

Wie man sieht, hat sich die Konzentration in Versuch VI gar nicht geändert, während in Versuch V die Prozentgehalte um 0,11 differieren. Es würde sich danach um einen Zutritt von 6 ccm verdünnender Gewebsflüssigkeit zu 100 ccm der durchgespülten Lösung handeln, eine Verdünnung, welche angesichts der großen Differenz zwischen den Gefrierpunkten der verwandten NaCl-Lösung $\left[\triangle\ {1,255 \atop 1,260}\right]$ und des Kaninchenserums [0,56] für einen Ausgleich nicht in Betracht kommen kann, da sie den Gefrierpunkt nur um 0,07° herabzusetzen imstande wäre.

Um damit vergleichbare Werte für die entsprechende Leistung der Kaninchenerythrocyten zu erlangen, stellte ich nachstehenden Versuch (VII) an, bei dem das der Carotis entnommene Blut eines großen gesunden Hasen mit der in den Versuchen V und VI verwendeten hypertonischen NaCl-Lösung zusammengebracht wurde und zwar im Volumverhältnis von 20 Blut auf 25 NaCl-Lösung.

Versuch VII. Das Serum des Kaninchenbluts hatte einen $\triangle$ von — 0,565, — 0,560. Behufs Ermittelung des Körpervolumens wurde ein Versuch mit Koeppes Haematokrit gemacht, der jedoch versagte; es mußte daher zur Zentrifugierung im graduierten Rohr gegriffen werden, welche 30 bzw. 31 Proz. Körperchen ergab.

Die im obengenannten Verhältnis gemengte Blut-Chlornatriummischung wurde rasch umgeschüttelt, zentrifugiert und das „Serum" derselben ergab einen Gefrierpunkt von 0,96°, 0,96°.

Eine einfache Berechnung lehrt, daß sich das Blut in diesem Falle ebenso verhalten hat, wie sich irgend eine Lösung vom $\triangle$ 0,56 verhalten hätte, d. h. es muß von seiten der Blutkörperchen

durch Schrumpfen ein vollständiger Ausgleich zustande gebracht worden sein.

Im Anschluß an diese Versuche mit Lösungen isotonischer oder hypertonischer Neutralsalze untersuchte ich das Verhalten einer Reihe von Salzen, welche nach den Untersuchungen von Gryns*) und Hedin**) usw., in ihrem Verhalten gegenüber den roten Blutkörperchen aus der Reihe der bisher genannten Neutralsalze fallen, nämlich der Ammonsalze. Die genannten Autoren konnten nämlich für verschiedene Ammonsalze (besonders Halogensalze sowie Acetat) ein Eindringen in die Substanz der Erythrocyten konstatieren. Bei der Prüfung des Verhaltens dieser Salze gegen die Leberzellen verwendete ich drei Salze, für welche die Permeabilität der Erythrocytenwand nach den genannten Autoren verschieden groß ist (Chlorid, Acetat und Sulfat) und verwandte die beiden ersteren in isotonischer, das letztere in mäßig hypertonischer Lösung. Die in der Spülflüssigkeit zurückgebliebene Ammonsalzmenge wurde beim Chlorid aus dem Chlorgehalte, bei den beiden anderen Salzen aus dem Stickstoffgehalt ermittelt.

Versuch VIII. Normales, großes Kaninchen, Leber von der Vena portae aus mit NaCl-Lösung blutfrei gespült, dann NH_4Cl-Lösung nachgeschickt, deren Cl-Gehalt mit dem der erstverwendeten Lösung identisch war; die durchtretende Ammonchloridlösung wird in drei Proben zu je etwa 30 ccm tropfenweise unter Stauung der Leber aufgefangen. Die Analysenwerte sind in Tab. IV wiedergegeben.

Tabelle IV (Versuch VIII).

	Chlorgehalt (NaCl)
Chlornatriumlösung	1,09 Proz.
Chlorammonlösung	1,09 Proz. 1,09 „
Erste Spülflüssigkeit	1,09 Proz. 1,09 „
Zweite Spülflüssigkeit	1,085 Proz.
Dritte Spülflüssigkeit	1,08 Proz. 1,075 „

Wie man sieht, hat sich der Chlorgehalt der Lösung beim Durchtreten durch die Lebergefäße bei der ersten und zweiten

*) Pflügers Archiv 63.
**) Ebenda 68.

Portion überhaupt nicht geändert, bei der dritten Portion hingegen ist die im Sinne einer Abnahme gerichtete Differenz entschieden innerhalb der Fehlergrenzen gelegen: sie beträgt 0,001 Proz. im ganzen, bzw. etwa $^1/_{70}$ des Analysenwerts! Man wird hieraus schwerlich eine Aufnahme von NH_4Cl aus der durchtretenden Flüssigkeit in die Leberzellen ableiten können.

Ein weiterer, mit Ammonsulfat angestellter Versuch fiel im gleichen Sinne aus.

Versuch IX. Bei einem großen Kaninchen wird die Leber von der Vena portae aus mit isotonischer NaCl-Lösung und hinterher mit leicht hypertonischer Ammonsulfatlösung durchgespült; letztere Lösung wird tropfenweise in zwei Portionen aufgefangen. Die Versuchsresultate gibt Tab. V wieder.

Tabelle V (Versuch IX).

	Chlorgehalt (NaCl)	N-Gehalt
Chlornatriumlösung	1,20 Proz. 1,20 "	—
Ammonsulfatlösung	—	0,4397 Proz. 0,439 "
Erste Spülflüssigkeit	0,04 Proz. 0,035 "	0,427 Proz. 0,426 "
Zweite Spülflüssigkeit	0,04 Proz. 0,035 "	0,428 Proz. 0,429 "

Die beiden Spülwässer bestehen (nach dem Cl-Gehalt) aus 3,3 Proz. NaCl-Lösung und 96,7 Proz. Ammonsulfatlösung, sie sollten somit, wenn die Ammonlösung unverändert durchtritt, einen N-Gehalt von 0,425 Proz. enthalten. Der tatsächlich gefundene Wert beträgt bei der ersten Portion 0,427 und bei der zweiten 0,428 Proz.

Man kann somit auch diesen Versuch nur in dem Sinne verwerten, daß ein Einwandern von Ammonsulfat in die Leberzellen nicht stattfindet.

Im Anschluß an diese beiden gelungenen Versuche sei es gestattet, über einen methodisch nicht einwandsfrei gelungenen Versuch zu berichten, der mit einer schwach alkalisch reagierenden Lösung von Ammonacetat angestellt worden war.

Versuch X. Mittelgroßes Kaninchen, Spülung mit NaCl-Lösung ($\triangle = 0,65$; 1,12 Proz. NaCl); sodann mit Ammonacetatlösung ($\triangle = 0,66$; 0,252 Proz. N). Dabei versiegte der Strom trotz entsprechender Druckhöhe, die Flüssigkeit wurde leicht viscös und an der Leber traten punktförmige mattweißliche Herde auf, die bald konfluierten und dann stark über die Oberfläche vorragten. Das Spülwasser war mäßig eiweißreich und seine Analyse ergab 0,1 Proz. NaCl.

Die Stickstoffbestimmung wurde im Filtrat nach vorhergehender Fällung mit dem dreifachen Volum absol. Alkohol ausgeführt und ergab 0,219 Proz. N, während sich aus dem Chlorwert 0,228 erwarten ließe, unter der allerdings ziemlich wahrscheinlichen Annahme, daß das in Lösung gegangene Lebergewebe nicht eine nennenswerte Menge alkohollöslicher Stickstoffsubstanzen enthielt. Falls diese Annahme berechtigt ist, könnte man in diesem Versuch gewissermaßen den pathologischen Grenzfall für diese Reihe erblicken.

III. Verhalten der Leberzellen gegen Säuren.

Das Hauptziel der im nachstehenden wiedergegebenen Versuche war, an einer Reihe von für den Organismus unter normalen oder pathologischen Verhältnissen in Betracht kommenden Säuren zu studieren, wie sie sich bei gleichzeitiger Anwesenheit von Chlornatrium gegen die Leberzellen verhalten, d. h. ob sie überhaupt in das Lebergewebe eindringen und daselbst festgehalten werden und ob nur die zugesetzte Säure aus der Spülflüssigkeit verschwindet, oder auch, wie es z. B. bei der CO_2-Behandlung der Erythrocyten der Fall ist, ein Teil der im NaCl gebundenen Salzsäure, und unter welchen Bedingungen dies stattfindet.

Solche Versuche wurden angestellt mit Milchsäure, Kohlensäure und Schwefelwasserstoff. Doch mußte vorher in einem Versuche festgestellt werden, ob der Salzsäure im freien Zustande überhaupt die Fähigkeit zukomme, ins Gewebe aufgenommen und daselbst festgehalten zu werden.

1. Versuch mit Salzsäure.

Zu diesem Zwecke versetzte ich (Versuch XI) eine annähernd isotonische Lösung von NaCl mit freier HCl und führte diese Mischung in eine mit isotonischer Na_2SO_4 vorgespülte Leber ein und bestimmte in der gemischten Spülflüssigkeit die Menge Cl, SO_4 und die Acidität.

Tabelle VI (Versuch XI).

	Acidität	NaCl-Gehalt	H_2SO_4-Gehalt
Vorgespülte Sulfatlösung			1,533 Proz.
Salzsäure-Chlornatriumlösung	10 ccm = 7,95 $\frac{N}{20}$ 79,5 $\frac{N}{20}$ Proz.	1,10 Proz. 1,09 „	
Spülflüssigkeit	10 ccm = 3,7 $\frac{N}{20}$ (37 $\frac{N}{20}$ Proz.)	0,925 Proz. 0,920 „	0,1226 Proz.

Berechnet man aus dem Sulfatgehalt der Spülflüssigkeit das gegenseitige Mengenverhältnis der beiden verwendeten Lösungen, so ergibt sich, daß die Spülflüssigkeit aus 7 Proz. Sulfatlösung und aus 93 Proz. differentem Gemisch besteht; somit wäre, falls aus der Lösung keine Säure verschwunden wäre, in der Spülflüssigkeit ein Chlorgehalt von 1,02 Proz. und ein Aciditätswert von 7,4 ccm $\frac{N}{20}$ in 10 ccm zu erwarten.

Tatsächlich findet sich jedoch um 0,1 Proz. NaCl und um 3,6 ccm $\frac{N}{20}$ pro 10 ccm weniger. Die gleichzeitige Abnahme an Cl sichert vor dem Verdacht, die verschwundene Acidität sei durch aus dem Gewebe herausgewandertes Alkali gedeckt worden. Daß die Abnahme der Acidität der Chlorverarmung parallel geht, ergibt eine mit der zugesetzten Salzsäure angestellte Probe, wonach 10 ccm einer beliebigen Verdünnung derselben 19,2 ccm $\frac{N}{20}$-Lauge und 0,052 g NaCl entsprachen.

Das Ergebnis des Versuches war somit, daß von einer 1/33 Normal-HCl-Lösung bei Gegenwart von Kochsalz Salzsäure an das Lebergewebe abgegeben wird und zwar annähernd die Hälfte der vorhandenen freien Säure. Da die Möglichkeit der Aufnahme von HCl durch das Gewebe festgestellt war, so konnte somit an die Versuche mit anderen Säuren geschritten werden.

2. Versuche mit Milchsäure.

Es mußte also zunächst für Milchsäure ebenso festgestellt werden, ob dieselbe in das Gewebe einzudringen vermag und weiterhin, ob sie bei Gegenwart von NaCl die allein wandernde Säure ist oder ob sich am Aciditätsverluste auch ein Teil der im NaCl gegebenen Salzsäure beteiligt.

Dazu wurde zunächst ein Versuch in der bisher eingehaltenen Anordnung ausgeführt, bei dem zuerst mit isotonischer Sulfatlösung vorgespült und dann die mit Milchsäure versetzte NaCl-Lösung durchgeleitet wurde. In den Lösungen wurde Cl, SO_4 und Acidität (unter Benutzung von Spiro und Försters Indikator) sowie Na bestimmt, eine gesonderte Bestimmung der Milchsäure als solcher erwies sich als überflüssig.

Bezüglich der ersten Frage, nach dem Verhalten der Acidität überhaupt läßt sich mit Hilfe des Sulfatgehaltes der Spülflüssigkeit, welcher einer Zusammensetzung derselben aus 3 Proz. Sulfatlösung und 97 Proz. Chlorid-Milchsäuremischung entspricht, ermitteln, daß sich, wenn die Acidität der durchströmenden Säure

unbeeinflußt bliebe, eine Acidität der analysierten Spülflüssigkeit von 10 ccm = 9,9 ccm $\frac{N}{20}$-Lauge erwarten ließe. Tatsächlich weist gemischte Spülflüssigkeit aber eine Acidität von 10 ccm = 3,25 ccm auf. Diese Verminderung der Acidität könnte sowohl durch Fortwanderung von Säure als auch durch Heraustreten von Alkali aus dem Gewebe bedingt sein. Die gleichzeitig ausgeführte Natriumbestimmung (durch Wägung als Sulfat) widerlegt die Annahme einer Herauswanderung fixer Alkalien, da sie sich sehr dem für die ursprüngliche Lösung aus dem Cl-Wert zu erwartenden Werte nähert. Ein Heraustreten ist aber gewiß in diesem Maße nicht als wahrscheinlich anzunehmen.

Tabelle VII (Versuch XII).

	Proz. H_2SO_4 (Sulfat)	NaCl Proz.	Acidität	Na_2O
Sulfatlösung	1,593 Proz. 1,585 „			
Milchsäure-Chlornatrium	—	1,125 Proz. 1,14 „	10 ccm = 10,2 $\frac{N}{20}$ = 10,3 $\frac{N}{20}$ 102,5 $\frac{N}{20}$ Proz.	
Spülflüssigkeit	0,0596 Proz. 0,0579 „	1,03 Proz. 1,01 „	10 ccm = 3,2 $\frac{N}{20}$ = 3,3 $\frac{N}{20}$ 32,5 $\frac{N}{20}$ Proz.	15 ccm = 0,2216 Na_2SO_4 0,6420 Proz.

Über die zweite Frage gibt der Chlorwert der Spülflüssigkeit Aufschluß. Aus dem Sulfatgehalt berechnet sich in der gleichen Weise für die Spülflüssigkeit ein zu erwartender Chlorgehalt von 1,09 Proz. NaCl.; der tatsächlich gefundene Wert 1,02 bleibt etwas hinter diesem zurück. Die Differenz ist nicht groß, liegt aber doch gerade noch außerhalb der Versuchsfehler. Jedenfalls beträgt dieselbe nur einen geringen Teil der Aciditätsdifferenz.

Um über das Verhalten der Salzsäure genaueren Aufschluß zu gewinnen, wurden zwei weitere Versuche angestellt, bei denen einerseits etwas stärkere Säuremengen in Anwendung kamen, andererseits die Versuchsanordnung so geändert wurde, daß eine Änderung im Chlorgehalte entscheidender und übersichtlicher zum Ausdruck kommen mußte.

Es wurden nunmehr von einer NaCl-Stammlösung zwei Lösungen hergestellt, die den gleichen Chlorgehalt aufwiesen,

deren eine jedoch eine bestimmte Menge freier Milchsäure enthielt. Die Leber wurde mit der neutralen Lösung vorgespült, dann die Säure durchgeschickt und in den Flüssigkeiten der Chlorgehalt, bei einem Versuch auch der Na-Gehalt ermittelt. Da das Auffangen der Spülflüssigkeit erst erfolgte, nachdem die abtropfende Flüssigkeit deutlich sauer reagiert hatte, so kann man vielleicht auch die Aciditätswerte schätzungsweise verwerten.

Tabelle VIII (Versuche XIII bis XV).

Versuch		Proz. Chlorgehalt (NaCl)	Acidität	Proz. Natron-Gehalt (Na_2O)
XIII.	I. Neutrale Lösung	0,9 Proz.		
	II. Saure Lösung	0,90 Proz. 0,90 „	20 ccm = 3,1 $\frac{N}{4}$ (15,5 $\frac{N}{4}$ Proz.)	
	Spülflüssigkeit	0,80 Proz. 0,805 „	20 ccm = 0,9 $\frac{N}{4}$ (4,5 $\frac{N}{4}$ Proz.)	15 ccm = 0,283 Na_2SO_4 0,8211 Proz. Na_2O
XIV.	I. Neutrale Lösung	0,92		5 ccm = 0,111 g Na_2SO_4 0,969 Proz. Na_2O
	II. Saure Lösung	0,915	10 ccm = 5,1 $\frac{N}{10}$ (51 $\frac{N}{10}$ Proz.)	
	Spülflüssigkeit	0,86 0,86	10 ccm = 1,9 $\frac{N}{10}$ (19 $\frac{N}{10}$ Proz.)	5 ccm = 0,116 1,013 Proz. Na_2O
XV.	I. Neutrale Lösung	0,91		
	II. Saure Lösung	0,905		
	Spülflüssigkeit	0,81		

Wie ein Blick auf Tabelle VIII lehrt, bestätigt der Ausfall der Versuche das Ergebnis von Versuch XII. Es findet bei dieser Versuchsanordnung tatsächlich eine Abnahme des Chlorgehalts der durchströmenden Flüssigkeit statt, es wandert somit nicht nur die zugesetzte Milchsäure, sondern auch ein Teil der Salzsäure. In den mit stärkeren Säurelösungen angestellten Versuchen XIII und XV macht die Differenz 11 Proz. der Analysen-

werte, bzw. 0,1 Proz. im ganzen aus, liegt also sicher noch außerhalb der Fehlergrenze.

Im Anschluß daran wurde ein Versuch gemacht, Milchsäure bei Gegenwart eines Sulfats auf Lebergewebe wirken zu lassen, um festzustellen, ob auch Schwefelsäure ebenso wie Salzsäure von der Milchsäure aus ihrem Natriumsalz verdrängt wird.

Versuch XVI. Zu diesem Zwecke wurde eine Leber mit NaCl-Lösung gewaschen, sodann die Milchsäure-Natriumsulfatmischung durchgesandt und in der gemischten Spülflüssigkeit Cl, S und Acidität ermittelt.

Tabelle IX (Vers. XVI).

	Chlor (Proz. NaCl)	Proz. H_2SO_4	Acidität
Natriumchloridlösung	0,93		
Sulfat-Milchsäuregemisch		1,69 Proz.	X ccm = 6,3 $\frac{N}{10}$
Spülflüssigkeit	0,1 Proz.	1,45 Proz.	X = 0,95 $\frac{N}{10}$

Eine Berechnung des prozentischen Anteils der erst durchgespülten NaCl-Lösung und des Milchsäure-Sulfatgemisches an der gemischten Spülflüssigkeit ergibt unter Benutzung des Chlorwerts 14 Proz. NaCl-Lösung. Danach wäre ein 86 Proz. betragender Anteil der zweiten Flüssigkeit zu erwarten und diesem müßte entsprechen ein Schwefelsäurewert von 1,45 Proz. Tatsächlich findet sich 1,45 Proz. H_2SO_4, es findet also keine Abnahme des H_2SO_4-Gehaltes trotz der nach derselben Berechnung sich ergebenden bedeutenden Abgabe von Milchsäure (45 Proz.) statt.

Fassen wir nun die Ergebnisse der mit Milchsäure angestellten Versuche zusammen, so können wir feststellen, daß Milchsäure aus saurer Lösung in das Gewebe übergeht, daß die Aciditätsdifferenz in den erst auslaufenden Portionen bei der verwandten Lösung nahe bis zur Hälfte der ursprünglichen Konzentration heranreicht, daß für die Annahme eines Herauswanderns von Alkali aus dem Gewebe keine Anhaltspunkte gewonnen wurden; bezüglich des Verhaltens gleichzeitig in Form ihrer Alkalisalze anwesender Mineralsäuren konnte für die Salzsäure ein entschiedenes Bestreben, mit der Milchsäure mitzuwandern, konstatiert werden. Wie aus Versuch XIII bis XV erhellt, beträgt jedoch die ins Gewebe dringende Salzsäure nur einen kleinen Teil der die Lösung überhaupt verlassenden Säure. Schwefelsäure hingegen wurde durch Milchsäure aus ihren neutralen Natriumverbindungen überhaupt nicht verdrängt.



Am Schlusse der Beschreibung der mit freien ätzenden Säuren (HCl, Milchsäure) angestellten Versuche muß ich einer Beobachtung Erwähnung tun, welche bei all diesen Versuchen gemacht wurde. Während die Leber durch neutrale Reagenzien nur eine homogene tonfarbene Beschaffenheit annahm, traten beim Einfließen der sauren Lösungen an der Oberfläche zunächst kleinste punktförmige Inselchen von hellweißer Farbe und opakem Aussehen auf, welche sich bald vermehrten, durch Konfluenz sich vergrößerten und zu zackig begrenzten, mäßig elevierten, hellweißen, auffallend opaken, etwas derb anzufühlenden Inseln umwandelten. Diese offenbar als Nekrosen anzusprechenden Veränderungen traten bei den Säureversuchen konstant auf und unterschieden sich von den durch hypertonische Lösungen erhaltenen Nekrosen nur durch die blendend weiße Färbung.

Bei den nachfolgenden Versuchen mit Kohlensäure wurde etwas ähnliches niemals beobachtet.

3. Versuche mit Schwefelwasserstoff.

Die vorstehend geschilderten Versuche waren mit stark saure Eigenschaften aufweisenden Lösungen von unter gewöhnlichen Umständen tropfbar flüssigen Säuren angestellt worden, denen im freien Zustande die Fähigkeit zukommt, tierische Gewebe zu verätzen.

Ehe ich nunmehr an das Studium des Verhaltens der Kohlensäure schritt, erschien es wünschenswert, ein dieser ähnliches, nur schwach saure Eigenschaften aufweisendes, nicht ätzendes Gas heranzuziehen: den Schwefelwasserstoff.

Vorher mußte jedoch das Verhalten dieser Säure gegen die Erythrocyten, insbesondere die Einwirkung derselben auf die Chlorverteilung im Blute untersucht werden.

Versuch XVII. Es wurde Pferdeblut vom Gefrierpunkt $\triangle = 0{,}55$ zentrifugiert, der Cruor in einer NaCl-Lösung vom gleichen Gefrierpunkte suspendiert, ein Teil dieser Suspension $^1/_2$ Stunde lang mit H_2S behandelt, hinterher beide Portionen zentrifugiert; dabei zeigte sich, daß das Volum der mit H_2S behandelten Erythrocyten im Vergleich zu der Kontrollprobe sehr bedeutend zugenommen hatte, so daß es nur nach längerem Zentrifugieren gelang, aus 80 ccm Suspension eine zur Analyse ausreichende Menge von 5 ccm Außenflüssigkeit zu gewinnen. Der Chlorgehalt der Außenflüssigkeit bei der nicht mit SH_2 behandelten Probe betrug **1,05** bzw. **0,98** Proz., bei der mit SH_2 behandelten **0,86** Proz.

Wie man sieht, hat der Chlorgehalt der Außenflüssigkeit durch die Behandlung mit Schwefelwasserstoff merklich, wenn auch nicht sehr stark abgenommen. Der Schwefelwasserstoff verhält sich also gegen die Erythrocytensubstanz ähnlich wie die Kohlen-

säure, das Verhalten desselben gegen die Leberzellen (Versuch XVIII), bot daher um so größeres Interesse.

Versuch XVIII. Eine Kaninchenleber wird zuerst mit warmer NaCl-Lösung gespült, und sodann warme NaCl-Lösung vom gleichen Gehalt nachgeschickt, welche vorher mit H_2S behandelt war. In wenigen Minuten dunkelt die lichtgelbe Farbe der Leber auffallend und ist zu Ende des Versuchs stahlgraublau, stellenweise tiefdunkel; der Schnitt zeigt dieselbe Farbe; im abgeschabten Brei zeigen sich mikroskopisch zahlreiche blaue Körnchen.

Die durchgeflossene klare Flüssigkeit wird auf Cl untersucht.

Die verwendete H_2S-freie NaCl-Lösung hatte einen NaCl-Gehalt von 0,91 Proz., dieselbe wies nach dem Passieren der Lebergefäße einen Gehalt von 0,90, 0,905 auf; die gleichgestellte H_2S-haltige NaCl-Lösung wies nach Verlassen der Lebergefäße einen Gehalt von 0,905, 0,91 auf.

Ein Beweis für Permeabilität der Leberzellwände für die verwandte Säure ist in diesem Falle nicht weiter zu erbringen; er ist bereits in der diffusen intensiven Verfärbung des Organs gegeben. Wenn trotzdem der Chlorgehalt der H_2S-tragenden NaCl-Lösung unverändert geblieben ist, so kann man wohl nur annehmen, daß dem H_2S die Fähigkeit, Chlor in die Leberzellen hinein zu verdrängen, wie es die Milchsäure vermag, im Gegensatz zu seinem Verhalten im Blute nicht zukommt.

4. Versuche mit Kohlensäure.

Die im folgenden geschilderten Versuche bildeten das eigentliche Ziel der vorliegenden Arbeit; denn sie konnten unter den Säureversuchen die einzigen für physiologische Verhältnisse in Betracht kommenden sein, während die vorhin mitgeteilten Säureversuche unter Reaktionsbedingungen verliefen, welche mit Bestehenbleiben des Zelllebens unvereinbar waren, zum Teil auch bereits makroskopisch sichtbar zu Nekrosen geführt hatten. Der Zweck letzterer konnte daher nur sein, dem Verständnis der nun zu beschreibenden Versuche dienstbar zu werden.

Auch für die Kohlensäure wurde wiederum die Aufnahmefähigkeit der Gewebe für dieselbe und das Verhalten von gleichzeitig anwesendem NaCl während dieses Vorganges getrennt studiert. Aus versuchstechnischen Gründen mußte jedoch letztere Frage vorangeschickt werden.

Die Anordnung war dieselbe, wie sie bei den späteren Milchsäureversuchen war: es wurde erst mit NaCl-Lösung blutfrei gewaschen und hinterher eine NaCl-Lösung von derselben Konzentration, welche vorher mit (feuchter) CO_2 gesättigt (1/2 Stunde) worden war und welche, wie die späteren Versuche ergaben, stets reichliche Mengen CO_2 enthielt, durchgespült. Die Flüssigkeiten wurden auf Cl untersucht.

Die Ergebnisse dreier derartiger Versuche sind in Tabelle X zusammengestellt.

Tabelle X (Versuche XIX bis XXI).

Versuch	CO_2-freie NaCl-Lösung	CO_2-haltige NaCl-Lösung	CO_2-freie Spülflüssigkeit	CO_2-haltige Spülflüssigkeit
XIX.		1,07 Proz. 1,06 „		1,03 1,05
XX.	0,88 0,885	0,88 0,88	0,88 0,90	0,88 0,90
XXI.	1,13 1,13	1,14 1,135	1,13 1,12	a) 1,12 Proz. 1,12 „ b) 1,44 „ 1,14 „

Diese Versuchsreihe, welche mit isotonischen und leicht hypotonischen NaCl-Lösungen angestellt wurde, zeigt keinerlei Beeinflussung des Chlorgehalts der mit CO_2 gesättigten Lösung durch die Berührung mit Lebergewebe. Die Differenzen, welche Versuch XIX aufweist, sind zu klein, als daß man sie nicht als innerhalb der Fehlergrenze gelegen betrachten könnte. Sie betragen in maximo 0,04 Proz., während die Unterschiede der einzelnen Analysen 0,02 betragen. Behält man die großen Differenzen, welche der Chlorgehalt des Serums bei dem Hamburger-Limbeckschen Vorgange erfährt, im Auge, sowie ferner die entschieden größeren Differenzen im Chlorgehalt, welche bei Milchsäureversuchen erzielt wurden, so wird man berechtigt sein, anzunehmen, daß der CO_2 die Fähigkeit, Chlor aus NaCl zu verdrängen, den Leberzellen gegenüber nicht zukommt.

Um dem Einwand zu begegnen, es sei bei diesen Versuchen überhaupt keine CO_2 in die Gewebe hineingewandert, wurde in nachstehendem Versuche eine mit CO_2 gesättigte NaCl-Lösung in eine mit ausgekochter isotonischer Natriumacetat-Lösung vorher gespülte Leber einfließen gelassen, und in der einfließenden Lösung sowie im gemischten Spülwasser Cl- und CO_2-Bestimmungen (letztere nach der Pettenkoferschen Methode) ausgeführt.

Versuch XXII. Die einfließende NaCl-Lösung enthielt 0,96 Proz. NaCl und 50 ccm derselben banden 10,75 ccm $\frac{N}{10}$ Barytlösung.

Die gemischte Spülflüssigkeit enthielt 0,90 Proz. NaCl und 50 ccm derselben entsprachen im Mittel von 2 Analysen 8,45 ccm $\frac{N}{10}$ Barytlösung. Nach der aus dem Chlorwert zu berechnenden Verdünnung müßte, wenn

keine CO_2 entwichen wäre, der CO_2-Gehalt der Spülflüssigkeit ein solcher sein, daß 50 ccm 10,00 ccm $\frac{N}{10}$ Barytlösung entsprechen. Die Differenz von 3 ccm auf 100 ccm Spülflüssigkeit entfällt somit auf an das Gewebe abgegebene CO_2.

Es sei noch bemerkt, daß bei diesem Versuch chlorfreie und CO_2-freie Acetatlösung benutzt wurde, und daß die Entnahme der Probe für die CO_2-Bestimmung während des Abfließens der in die Leber strömenden Portion erfolgte, um ein nachträgliches Entweichen von CO_2 aus der warmen Lösung zu verhindern.

Wie man sieht, hat die vorbeiströmende Lösung 15 Proz. ihres CO_2-Gehalts an die Leberzellen abgegeben; es erscheint dadurch der immerhin mögliche Einwand widerlegt, daß die Differenz in der Kohlensäurespannung zwischen der Spülflüssigkeit und den Zellen zu gering gewesen sei, um innerhalb der Zeit des Durchströmens einen Austausch herbeizuführen.

Vergleicht man die mit den verschiedenen Säuren erhaltenen Resultate mit den Vorgängen bei den Erythrocyten, so muß man zunächst feststellen, daß schwache gasförmige Säuren (SH_2, CO_2), deren Aufnahme bei letzteren sich unter Chlorwanderung vollzieht, bei den Leberzellen ungehindert zur Aufnahme gelangen, ohne daß dabei eine Änderung im Chlorgehalte der Spülflüssigkeit eintritt; man kann wohl annehmen, daß der Mechanismus des Austausches dieser Säuren bei den Leberzellen ein anderer ist, als bei den Erythrocyten, bei denen einer eingeschränkten Aufnahme des Gases selbst Einwanderung von Chlor in die Körperchen entspricht.

Während schwach saure Gase bei den Leberzellen nicht imstande sind, Chlorwanderung zu erzeugen, beobachtet man doch bei stärker saure Eigenschaften entwickelnden Flüssigkeiten einen ähnlichen Vorgang. Es ist wohl möglich, daß derselbe analog der Chlorwanderung im Blute einer verschiedenen Aufnahmefähigkeit der Leberzellen für die beiden Säuren (HCl u. Milchsäure) seine Entstehung verdankt, es wäre jedoch auch nicht ausgeschlossen, daß es sich hierbei nur um eine Aufnahme von Cl in die vorher durch die Säurewirkung nekrotisierten Zellen handelt, und es geht daher nicht wohl an, diesen, bei deutlich saurer Reaktion unter makroskopisch sichtbarer Nekrosenbildung verlaufenden Vorgang mit der nach Hamburger selbst im lebenden Körper sich abspielenden Chlorwanderung im Blute zu vergleichen.

In Abschnitt V wird über weitere Versuche über die Aufnahmefähigkeit der lebenden Leberzellen für Chlor berichtet werden.

5. Versuche an Phosphortieren.

Das Nichtbestehen der Chlorwanderung unter CO_2-Einwirkung hat sich als eine dem Lebergewebe zukommende Eigentümlichkeit (gegenüber dem Verhalten der Erythrocyten) herausgestellt. Da solche den verschiedenen Gewebsterritorien eigene Reaktionen zweifelsohne mit dem chemischen Aufbau und der Struktur der Gewebe zusammenhängen, war es mir von Interesse, zu verfolgen, wie sich Leberzellen, welche in ihrer chemischen Zusammensetzung und Textur verändert sind, unter den gleichen Bedingungen verhalten. Ich wählte hierfür Phosphorlebern, von denen es erwiesen ist, daß ihr Gewebe fettig degeneriert und durch Autolyse in seiner chemischen Zusammensetzung (vgl. das Auftreten von Leucin, Tyrosin) tiefgreifend verändert erscheint.

Versuch XXIII und XXIV. Zwei Kaninchen wurden durch Injektion von 100 ccm Phosphoröllösung durch die Schlundsonde vergiftet und etwa 36 Stunden danach operiert, da Vorversuche ergeben hatten, daß später rasch der Tod erfolgte oder die Vena cava thrombosiert war. In beiden Fällen zeigte die Leber die typische scheckige Beschaffenheit. Die Versuchsanordnung war die gleiche wie bei den Versuchen auf Tabelle X.

Tabelle XI (Versuche XXIII bis XXIV).

Versuch	CO_2-freie NaCl-Lösung	CO_2-haltige NaCl-Lösung	Spülflüssigkeit
XXIII.	0,94 Proz.	0,945 Proz. 0,945 „	0,95 0,945
XXIV.	0,9 Proz.	0,90 Proz. 0,90 „	0,88 Proz. 0,89 „

Versuch XXIII zeigt überhaupt keine Differenzen, bei Versuch XXIV liegen sie innerhalb der Analysenfehler.

Es wird sich somit aus diesen beiden Versuchen kein Anhaltspunkt dafür gewinnen lassen, daß die in ihrer Textur und Zusammensetzung geschädigte Zelle ihre Eigenart im Verhalten gegen verschiedene Säuren verläßt.

Es wäre sicherlich widersinnig, diesem Resultate irgend eine Verallgemeinerung auf das Verhalten gegen andere sich verteilende Substanzen zu geben, aber für vorliegende Frage erscheint es mir wichtig, daß die in ihrem verschiedenen Verhalten gegen Säuregemische gegebene Eigenart der Gewebe auch bei hochgradigen materiellen Veränderungen beibehalten werden kann.

IV. Verhalten der Leberzellen gegen alkalische Lösungen.

Die vorstehenden Versuche haben eine Permeabilität der das Zellinnere gegen die Gefäße abgrenzenden Schichte für Säuren in der Richtung von außen nach innen dargetan. Weit wichtiger wäre es noch, über die Durchlässigkeit dieser Membran für Säuren in umgekehrter Richtung etwas zu erfahren, da diese Funktion für verschiedene Säuren (CO_2, organische Säuren) unter normalen und pathologischen Zuständen eine lebenswichtige Rolle zu spielen scheint. Die Kohlensäure mußte aus technischen Gründen außer acht gelassen werden und es erübrigte somit nur die Frage nach organischen, der Milchsäurereihe nahestehenden Säuren. Es ergab sich dabei weiterhin die Notwendigkeit, auf Säuren, welche auch bei Durchspülen mit neutralen Reagenzien in irgend einer Form heraustreten würden, zu verzichten und die Frage dahin zu richten, ob die normale, eben dem Kreislauf durch Spülung mit indifferenten isotonischen Agenzien entzogene Leber einen Säurevorrat besitzt, den sie an durchströmendes Alkali abzugeben vermag.

Zuerst wurden Durchspülungsversuche mit warmen Natriumhydroxydlösungen, denen die zur Erhaltung der Isotonie nötigen Mengen Neutralsalz (Na_2SO_4) zugesetzt waren, ausgeführt. Dabei zeigte sich aber ein lösender Einfluß des Alkali auf das Gewebe. Der Abfluß begann zu stocken, es kam dann eine erst leicht opalisierende, endlich bräunlich milchartige viscöse Flüssigkeit, die auf Säurezusatz eine dicke, flockige Fällung gab, und gleichzeitig färbten sich einzelne Partien der Leberoberfläche dunkel, wurden durchscheinend, gallertig, buchteten sich vor und endlich sickerte an diesen Lücken Flüssigkeit aus, zwischen denen ein netzartiges Maschenwerk überblieb.

Auch verdünnte, warme Natriumkarbonat-Lösungen erzeugten den gleichen Vorgang und erst die Anwendung kalter etwa $^1/_{11}$ Normal-Natriumkarbonat- mit isotonischer Na_2SO_4-Lösung führte zu einer klaren, eiweißfreien Spülflüssigkeit.

Ein in dieser Art angestellter Versuch hatte folgendes Ergebnis:

Versuch XXV. Normale Kaninchenleber wird mit lauwarmer (etwa 20° warmer) NaCl-Lösung möglichst rasch und kurzdauernd blutfrei gespült, sodann eine Mischung von isotonischer Natriumsulfat- und isotonischer Natriumkarbonatlösung von unten angegebener Alkalinität durchgesandt. Das leicht abtropfende klare, eiweißfreie Spülwasser wurde auf Cl und Alkalinität untersucht.

Von der Sulfatkarbonatmischung entsprachen 10 ccm $\frac{4,30}{4,35}$ ccm $\frac{N}{10}$ Säure. Die zur Reinspülung verwendete NaCl-Lösung war 0,88 prozentig.

Die gemischte Spülflüssigkeit enthielt $\frac{0,070}{0,072}$ Proz. NaCl und 5 ccm derselben entsprachen 1,85 bzw. 1,95 ccm $\frac{N}{10}$ Säure.

Die Verdünnung durch die aus dem Chlorgehalt zu berechnende Menge der Chlornatriumlösung würde ein Gemisch von der Alkalinität 10 ccm = 3,95 ccm $\frac{N}{10}$ bedingen; die tatsächlich gefundene Alkalinität 10 ccm = 3,8 nähert sich diesem Werte so sehr, daß man nicht von einer Änderung der Alkalinität durch die Durchspülung sprechen kann.

Es scheinen somit gegen Methylorange wirksame Säuren aus dem normalen Lebergewebe an alkalische Flüssigkeiten nicht abgegeben zu werden.

Um so einladender erschien mir der Versuch, das Verhalten von mit Säuren vergifteten Tieren nach dieser Richtung zu prüfen. Da sich nach Walters*) Untersuchungen bei den mit Säure vergifteten Kaninchen eine bedeutende Abnahme der Alkalescenz des Blutes vorfindet, so mußte man daran denken, daß auch die Alkalescenz der Gewebe bei solchen Tieren in derselben Richtung beeinflußt sein könnte; es kam mir dabei hier im Gegensatz zu den weiter unten geschilderten Versuchen nicht auf die Art der supponierten Säure im Gewebe an, es sollte nur festgestellt werden, ob sich beim Zusammenbringen von Geweben säurevergifteter Tiere mit alkalischen Lösungen ein Ausgleichsstrom einstellt oder nicht, ganz ohne Rücksicht darauf, ob die heraustretende Säure intermediär entstanden oder die zur Vergiftung verwendete in Substanz ist.

Versuch XXVI. Zu diesem Zwecke erhielt ein kräftiges 1 ½ kg schweres Kaninchen im Laufe von 6 Stunden 200 ccm einer Phosphorsäurelösung (Acid. phosph. glaciale), welche einer ⅓ Normalsäure entsprach, (per ösophag).

Bei dem schwer dyspnoischen Tier wurde die Vena portae aufgesucht, mit NaCl-Lösung das Blut entfernt und sodann eine mit Na_2SO_4-Lösung vermengte verdünnte kühle Natriumkarbonatlösung (chlorfrei) nachgesandt.

Irgend welche Verätzungen traten an der Leber nicht auf, die Lösung blieb eiweißfrei.

Die NaCl-Lösung enthielt 1,12 Proz. NaCl. Die Karbonatlösung war so gestellt, daß 20 ccm 4,25 bzw. 4,2 ccm $\frac{N}{20}$ HCl entsprachen (Methylorange). Die gemischte Spülflüssigkeit enthielt 0,04 Proz. NaCl (über-

*) Betreffs Literatur und Technik der Versuche siehe Abschnitt V.

einstimmend) und 10 ccm derselben entsprachen 2,05 bzw. 2,00 ccm $\frac{N}{20}$ Säure. Nach dem Chlorgehalt wäre, wenn eine Konzentrationsänderung nicht erfolgt, eine Alkalinität der gemischten Spülflüssigkeit entsprechend 10 ccm = 2,05 ccm $\frac{N}{20}$ zu erwarten, was mit dem tatsächlich gefundenen völlig übereinstimmt.

Die durchtretende Karbonatlösung hat gleich wie beim normalen Tier keine Reaktionsänderung erfahren; das Ergebnis dieses Versuchs bestätigt somit unsere Erwartung, daß die Leber säurevergifteter Tiere über gegen Methylorange wirksame, leicht diffusible Säuren verfüge, welche sie an vorbeiströmende Alkalien abzugeben vermag, in keiner Weise. Ich erachte trotzdem diese Frage nicht für abgeschlossen, und hoffe, in kurzem derselben in anderer Versuchsanordnung nahetreten zu können.

V. Verhalten der Leberzellen bei der Säurevergiftung.

In der früher erwähnten Untersuchung über die Chlorwanderung bei den Erythrocyten setzte ich zu abzentrifugiertem Serum eine unterhalb dessen nativer Alkalescenz gelegene Salzsäuremenge zu, und vereinigte Serum und Cruor; dabei konnte nachgewiesen werden, daß ein beträchtlicher Anteil Chlor in die Erythrocyten eindrang.

Ich verglich nunmehr diesen Vorgang mit der Chlorwanderung bei CO_2-Behandlung und supponierte in beiden Fällen ähnliche Ursachen für das Eintreten von Cl in die roten Blutkörperchen. Wenn ich nunmehr bestrebt bin, die an den Erythrocyten untersuchten Verhältnisse bei den Leberzellen nachzuprüfen, so muß ich erkennen, daß die bisher (Abschnitt III dieser Arbeit) mitgeteilten Versuche zwar die Permeabilität der Leberzellen für Chlor dargetan haben, daß sie sich jedoch mit dem letzterwähnten Versuch an den roten Blutkörperchen nicht vergleichen lassen, da sie mit freie HCl enthaltenden Lösungen angestellt wurden, und da sie zu bereits makroskopisch sichtbaren Nekrosen geführt hatten. Es ergibt sich somit die weitere Frage: vermag Salzsäure auch unter solchen Bedingungen, wie sie dem obigen Versuch an Erythrocyten entsprechen, in die Leberzellen einzudringen. Es mußte somit eine Versuchsanordnung ermittelt werden, welche bei Einhaltung der für die Erhaltung des Zellebens unerläßlichen Bedingungen (d. h. ohne freie Säure, ohne Nekrosebildung) gestattet, das Verhalten der dem Blute innerhalb seiner nativen Alkalescenz zugesetzten HCl gegen das Lebergewebe zu prüfen. Dies erschien um so wichtiger, als sich in Abschnitt III ergeben

hatte, daß die Leberzellen für durch CO_2 in Freiheit gesetzte Salzsäure keine Aufnahmefähigkeit besitzen.

Ich glaubte, diesen Fragen am besten nähertreten zu können, indem ich studierte, wie sich die einem Tier per os beigebrachte Salzsäure beim Zustandekommen einer tödlichen Säurevergiftung gegen die Leberzellen verhält. Die Berechtigung dieser Versuchsanordnung erhellt schon aus den Befunden Walters*) von enormer Alkalescenzverminderung im Blute der mit Säure vergifteten Tiere, noch viel mehr aus den Versuchen Winterbergs**), welche beweisen, daß das Blut von mit Salzsäure vergifteten Kaninchen an Chlor wesentlich reicher ist als das Blut normaler Tiere.

Diese Versuchsanordnung bot aber außerdem auch für die Mechanik der Säurevergiftung ein gewisses Interesse. Walter hatte bereits festgestellt, daß sich bei Zufuhr von Mineralsäuren die Aufnahmefähigkeit des Blutes für Kohlensäure bedeutend verringert, während der Sauerstoffgehalt desselben unverändert bleibt. Kraus und Chvostek***) haben weiterhin ermittelt, daß trotz diesem ungeschmälerten Gehalt des Blutes an Sauerstoff die respiratorische Aufnahme von Sauerstoff durch die Lungen beim Säuretier bedeutend herabgesetzt erscheint. Chvostek zieht aus seinen und Walters Befunden den Schluß, daß die Ursache der mangelhaften Sauerstoffaufnahme durch die Lungen eine mangelhafte innere Atmung der Gewebe sein müsse, daß somit der Organismus eines Säuretiers sich im Zustande einer inneren Erstickung befinde. Dieser Umstand läßt die Möglichkeit ins Auge fassen, daß die vergiftende Säure nach Analogie des Erythrocytenversuchs vom Blute aus selbst in die Gewebe vordringt und ebenso wie sie im Blute die für die Aufnahme von CO_2 bestimmten Affinitäten belegt, auch im Gewebe durch Abstumpfung der normalen Alkalescenz den Ablauf der oxydativen Vorgänge hemmt. Es war somit auch von diesem Gesichtspunkte aus von Interesse, zu sehen, ob der Chlorgehalt der Organe mit HCl vergifteter Tiere ein höherer ist, als der normaler Kontrolltiere.

Die einschlägigen Versuche wurden zunächst an Kaninchen begonnen und später auf Hunde ausgedehnt.

Vorerst ermittelte ich den Chlorgehalt der Leber bei drei normalen Kaninchen und bezog denselben auf Trockengewicht

*) Archiv f. exper. Pathologie u. Pharmakologie 7.
**) Zeitschr. f. physiol. Chemie 25, 1898.
***) Centralbl. f. klin. Medizin 14, 329.

und Stickstoffgehalt. Es ergab sich dabei die Notwendigkeit, das relativ chlorreiche Blut vorher aus den Gefäßen zu entfernen und ich erreichte dies, indem ich die Leber der in Äthernarkose befindlichen Versuchstiere von der Vena portae aus in der oben (s. Methodik) beschriebenen Weise mit chlorfreier Na_2SO_4-Lösung (in einem Versuche mit Rohrzuckerlösung) blutfrei spülte, was angesichts der durch frühere Versuche erwiesenen Tatsache, daß isotonische Sulfatlösung aus den Leberzellen keine Chlorionen aufnimmt, gestattet erscheint. Die Leber wurde, sobald sie in toto homogen lehmfarbig geworden, und das Spülwasser blutfrei war, excidiert, und nach Entfernung der Gallenblase gewogen, zerkleinert und nun der Analyse zugeführt.

Die Chlorbestimmungen werden in der Weise ausgeführt, daß Gewebsbrei mit etwa 5 g chlorfreiem Natriumkarbonat in Nickelschalen eingedampft, der Rückstand bei gelinder Rotglut verkohlt, die Kohle mehrmals mit heißem Wasser extrahiert wurde; das Extrakt wurde durch ein aschefreies Filter filtriert, das Filter samt der Kohle getrocknet, völlig verascht, die Asche mit heißem Wasser aufgenommen, filtriert, beide Extrakte vereint, nach dem vollständigen Erkalten mit chlor- und salpetrigsäurefreier verdünnter Salpetersäure auf saure Reaktion gebracht, in einen 200 ccm fassenden Kolben gebracht und nach Arnold titriert.

Es zeigte sich, daß die Differenzen zwischen den einzelnen Kontrollanalysen dieselben Grenzen einhielten, wie bei den nach einer sehr ähnlichen Methode ausgeführten Chlorbestimmungen im Serum und Blut, über die ich in der früheren Mitteilung berichtete, nämlich maximal 0,02 Proz.

Ich lasse nunmehr die Versuchsergebnisse folgen.

Versuch XXVII. Die Leber eines normalen, großen Hasen wird in der beschriebenen Weise mit Sulfatlösung gespült und untersucht:

10,486 g enthalten . . . . . 0,0070 g NaCl
12,22 g enthalten . . . . . 0,008 g NaCl,

woraus sich ein **NaCl-Gehalt** von **0,067** bzw. **0,060** Proz. ergibt.

2,948 g enthalten . . . . 0,0579 g N
3,066 g „ . . . . 0,0579 g N,

was einem N-Gehalt von 1,9 bzw. 1,8 Proz. entspricht.

Versuch XXVIII. Die 66 g wiegende Leber eines großen normalen Kaninchens (Sulfatspülung) liefert folgende Werte:

8,635 g enthalten . . . . . . 0,008 g NaCl
9,92 g „ . . . . . . 0,007 g NaCl,

woraus sich ein **NaCl-Gehalt** von **0,09** bzw. **0,07** Proz. ergibt.

1,3475 g Leber liefern 0,412 g Trockensubstanz, was einem Gehalt von **30,5 Proz.** entspricht.

Versuch XXIX. Die 62 g schwere Leber eines normalen großen Kaninchens (Sulfatspülung) ergibt folgende Resultate:

5,65 g enthalten . . . . . . 0,003 g NaCl
4,51 g „ . . . . . . 0,0035 g NaCl,

woraus sich ein **NaCl-Gehalt** von **0,05** Proz. bzw. **0,07** Proz. ergibt.

1,6865 g Substanz liefern 0,3975 Trockensubstanz, was einem Gehalt von 24 Proz. entspricht.

Die angeführten Zahlen, welche meines Wissens die ersten am vom Blute befreiten Lebergewebe gewonnenen Resultate darstellen, zeigen einen überraschend niedrigen Chlorgehalt des Lebergewebes an, welcher zwischen 0,05 Proz. und 0,09 Proz. zu schwanken scheint.

F. Martz*) gibt in seiner These „Physiologie du foie" den Chlorgehalt der Leber auf Grund eigener Versuche zu 1,5 Proz. der 8 bis 12 Proz. betragenden Asche an.

Diese auffallend niedrigen Werte verdienen insbesondere im Vergleich mit dem hohen Chlorgehalt der Elemente des Bluts Beachtung. Sie zeigen nicht nur die unerwartete Tatsache, daß für die lebenswichtigen Vorgänge, welche sich in den chemisch so aktiven Leberzellen abspielen, die Anwesenheit von Spuren Chlornatrium genügt, sondern sie gewähren auch einen Einblick in die eigenartigen, dem Organismus zu Gebote stehenden Kräfte, mittels welcher er die Ausbreitung selbst so leicht diffusibler Substanzen zu beherrschen vermag, indem die mit dem chlorreichen Blute in stetem Austausch stehenden Leberzellen sich diesem gegenüber ihren geringen Chlorgehalt wahren.

Nunmehr ging ich daran, Kaninchen, welche ich nach der zuerst von Walter angewendeten Methode durch Eingabe von Salzsäure per ösophag. vergiftet hatte, in ähnlicher Weise zu verarbeiten, indem ich die mit isosmotischen chlorfreien Neutrallösungen blutfrei gespülte Leber der Analyse zuführte.

Die Spülung mit Neutrallösungen läßt ein Bedenken offen, daß nämlich locker gebundenes Chlor dadurch den Leberzellen entrissen werde, eine Möglichkeit, die allerdings durch die mehrfach auch bei Säureversuchen konstatierte Chlorfreiheit der blutfrei gewordenen Spülflüssigkeiten sehr an Wahrscheinlichkeit einbüßt. Ich habe dennoch bei diesen Versuchen stets darauf geachtet, daß nicht zu viel Spülflüssigkeit (maximal 0,5 l) in Verwendung kam.

Die Salzsäurevergiftung erfolgte durch Zufuhr einer 1/8 No-HCl-Lösung durch die Schlundsonde und stets in mehreren Sitzungen, so daß erst eine unter der von Walter als letal bezeichneten Dosis (0,9 pro kg) gelegene Menge, erst nach einigen Stunden der Rest verabfolgt und das Tier auf der Höhe unmittelbar vor dem zu erwartenden Tode verarbeitet wurde.

---

*) Lyon 1897.

In diesen präagonalen Stadien fiel meist eine vollständige Lähmung der gesamten Muskulatur auf. Das Tier lag flach auf dem Boden, hielt den Kopf wie an den Boden gepreßt, die vier Extremitäten von sich gestreckt, und konnte durch Aufheben in jedwede von der Schwere diktierte Stellung gebracht werden. Die Muskulatur fühlte sich vollkommen atonisch an; die Tiere waren ganz ausgekühlt.

Im nachfolgenden gebe ich die Versuchsergebnisse wieder.

Versuch XXX. Ein 3400 g schwerer, feinhaariger Hase bekommt im Laufe von 20 Stunden 3 g HCl per os; 12 Stunden nach der ersten Eingabe Beginn der schweren Erscheinungen, nach weiteren 8 Stunden Tod. Unmittelbar darauf (bei noch schlagendem Herzen) Operation in der geschilderten Weise. Spülung mit Rohrzuckerlösung.

Gewicht der Leber 103 g.

9,16 g enthalten . . . . . . 0,0065 g NaCl
9,6 g „ . . . . . . 0,00675 g NaCl,

was einem **NaCl-Gehalt** von **0,071** und **0,07** Proz. entspricht.

2,4 g enthalten . . . . 0,0798 g N
1,9 g „ . . . . 0,06055 g N,

was einem **N-Gehalt** von **3,3** Proz. bzw. **3,18** Proz. entspricht.

Versuch XXXI. Ein Hase von 2900 g Körpergewicht bekommt von einer 0,54 Proz. HCl enthaltenden Lösung erst 150 ccm (wovon er einen kleinen Teil erbricht), nach 4 Stunden 200 ccm, nach weiteren 2 Stunden 100 ccm. Danach traten schwere Lähmungserscheinungen auf, es wird etwa 7½ Stunden nach der ersten Eingabe die Carotis eröffnet, es gelingt jedoch kaum, 10 ccm Blut aus derselben zu erhalten. Aufsuchung der Leber, Spülung mit $NaSO_4$.

6,95 g enthalten . . . . . . 0,007 g NaCl
9,897 g „ . . . . . . 0,011 g NaCl,

woraus sich ein **NaCl-Gehalt** von **0,1** Proz. und **0,11** Proz. ergibt.

0,9875 g enthalten . . . . . . 0,0217 g N
2,558 g „ . . . . . . 0,0567 g N,

was einem **N-Gehalt** von **2,17** Proz. bzw. **2,21** Proz. entspricht.

Versuch XXXII. Ein Hase von 2500 g bekommt im Laufe von 4 Stunden 450 ccm einer $\frac{N}{8}$ HCl-Lösung. In der letzten Stunde liegt das Tier, ganz ausgekühlt, schwer benommen, wie ein flacher Kuchen am Boden. Operation, Spülung der Leber mit Natriumsulfat, Gewicht der Leber 58 g.

6,295 g enthalten . . . . . . 0,004 g NaCl
6,085 g „ . . . . . . 0,004 g NaCl,

was einem **Chlorgehalt** von **0,063** bzw. **0,066** **NaCl** entspricht.

2,304 g enthalten 0,702 g Trockengewicht, was einem **Proz.-Gehalt** von **30,5** Proz. entspricht. (Siehe Tabelle XII auf folgender Seite.)

Nebenstehende Tabelle XII gibt die Ergebnisse der 6 Versuche in zusammenfassender Darstellung. Wie man sieht, schwanken die prozentischen Chlorwerte in den 6 Versuchen zwischen 0,05 und 0,11 Proz.; der letzterwähnte höchste Wert findet sich aller-

dings bei einem Säuretier; bedenkt man jedoch, wie nahe diesem Wert der Chlorgehalt des gesunden Kaninchens bei Versuch XXVIII (0,09 Proz.) kommt, erwägt man ferner, daß die Schwankungen des Gehalts an Cl innerhalb der 3 Säuretiere große sind, daß insbesondere in Versuch XXX der schwervergiftete Hase unmittelbar nach dem Tode einen sehr niedrigen Chlorgehalt (0,07 Proz.) aufwies, so wird man in diesen Zahlen wohl schwerlich den Ausdruck eines Eindringens von Salzsäure in die Leberzellen erblicken können, sondern man wird vielmehr feststellen müssen, daß die angeführte Versuchsreihe gegen das Eindringen wenigstens von nicht durch chlorfreie Neutrallösungen wegspülbaren Chlormengen in die Leberzellen spricht.

Tabelle XII (Versuche XXVII bis XXXII).

Versuch	Chlorgehalt d. Lebergewebes (Proz. NaCl)	Trockengehalt (Leber)	N-Gehalt (Leber)	Gewicht der Leber
XXVII. Normal	0,067 Proz. 0,060 „	—	1,9 Proz. 1,8 „	—
XXVIII. Normal	0,09 Proz. 0,07 „	30,5 Proz.	—	66 g
XXIX. Normal	0,05 0,07	24 Proz.	—	62 g
XXX. HCl	0,07 Proz. 0,071 „	—	3,3 Proz. 3,18 „	103 g
XXXI. HCl	0,10 Proz. 0,11 „	—	2,1 Proz. 2,2 „	—
XXXII. HCl	0,06 0,063	30,5 Proz.	—	58 g

Damit gewinnt der erwähnte Vergleich des Verhaltens der Erythrocyten mit dem der Leberzellen an Vollständigkeit.

Die ersteren nehmen Chlor aus einer mit CO_2 beschickten Kochsalzlösung auf, sie nehmen aber auch dem Serum unterhalb seiner nativen Alkalescenz zugesetzte HCl in sich auf, die Leberzellen hingegen, deren Wand bei Vorhandensein freier organischer (Milchsäure) oder anorganischer Säure für Chlor durchgängig ist, nehmen aus einem $NaCl$-CO_2-Gemisch keine Säure auf und sie ver-

mögen auch die dem Blute zugesetzte Salzsäure (bei der Säurevergiftung) nicht in sich aufzunehmen.

Anschließend an die bei Kaninchen angestellten Untersuchungen habe ich einen orientierenden Versuch gemacht, das Verhalten der Leberzellen des Hundes bei Säurevergiftung zu prüfen.

Zu diesem Zwecke verglich ich den Chlorgehalt der Leber eines normalen Hundes mit den entsprechenden Befunden an einem mit Salzsäure vergifteten Tiere.

Versuch XXXIII. Ein etwa 5 kg schwerer junger Rattler wird mit 0,02 g Morf. hydrochl. und sodann mit Äther narkotisiert, durch Verbluten getötet, gleichzeitig die Porta hepatis aufgesucht und während das Tier noch atmet, die Leber in der beschriebenen Weise mit Sulfatlösung blutfrei gespült. Letztere ist 110 g schwer.

11,8 g Leberbrei entsprechen . 0,004 g NaCl
10,29 g „ „ . 0,004 g NaCl,

was einem **Cl-Gehalt** von **0,034** bzw. **0,04** Proz. entspricht.

Versuch XXXIV. Ein 6 kg schwerer junger Rattler bekommt mittags 150 ccm 0,63proz. HCl per os, 2½ Stunden danach abermals 200 ccm einer 0,86proz. Lösung per os. Die Menge wird gut vertragen. Um 5 Uhr abends abermals 200 ccm einer 0,86proz. Lösung per os, das Tier wird darauf matt und bricht gegen 7 Uhr. Sodann wird um 7 Uhr in Narkose erst Blut entnommen und sodann die Leber in der beschriebenen Weise mit Sulfatlösung gereinigt. Gewicht der Leber 172 g.

11,531 g enthalten . . . . . 0,0035 g NaCl
9,3196 g „ . . . . . 0,0030 g NaCl,

was einem **Chlorgehalt** von **0,03** bzw. **0,032** Proz. entspricht.

Die gleichzeitige Untersuchung des Blutes ergab in 10 ccm 0,0615 bzw. 0,0600 g NaCl.

Das Ergebnis der beiden Experimente ermutigte mich nicht zu einer Vornahme weiterer Versuche; es macht entschieden den Eindruck, daß eine Verschiedenheit im Chlorgehalte der Leber beim normalen und beim mit HCl vergifteten Tiere nicht besteht, ja daß auch die absoluten Mengen Chlor in der Leber keine auffallenden Differenzen zeigen, wie der Vergleich der 0,04 g NaCl als Gesamtmenge NaCl in der Leber des normalen mit den 0,05 g NaCl in der Leber des Säurehundes zeigt.

Es ist das ein Befund, der für die Mechanik der Säurevergiftung weiteres Interesse beansprucht; denn wie Walter bereits gezeigt hat, kommt beim Hunde nach Säurezufuhr nicht der gleiche toxische Symptomenkomplex zustande wie beim Kaninchen, die Tiere gehen nicht zugrunde und wie sich bei der Untersuchung des Harns zeigte, scheiden sie die verfütterte Säure als Ammoniaksalz (auf Kosten des Harnstoffs) aus. Es wäre somit gerade für den Organismus des Fleischfressers aus diesem weiteren Grunde

die Anwesenheit der verfütterten Säure in den der Harnstoffsynthese vorstehenden Leberzellen als wahrscheinlich zu betrachten. Nun ist ja gerade für die Verhältnisse beim Fleischfresser, wo man nicht, wie beim Kaninchen, die Möglichkeit hat durch Untersuchung der Verhältnisse in agone sicher den Endpunkt physiologischer Verhältnisse aufzufinden, der Einwand möglich, man habe gerade nicht den günstigen Moment, in dem sich die Säurewirkung am Höhepunkt befand, getroffen, aber immerhin bleibt es merkwürdig, daß nach 7stündiger successive fortgesetzter Applikation von im Ganzen über 4 g HCl das Organ, in dem man zunächst die Bildungsstätte für das ausgeschiedene Ammonchlorid vermuten sollte, im ganzen nur 0,05 g NaCl enthält.

Jedenfalls berechtigt der Ausfall des Versuchs zur Annahme, daß eine momentane Überschwemmung der Leber mit Chlor auch beim Hundeorganismus bei HCl-Vergiftung nicht statthat.

VI. Schlußbemerkungen.

Es erübrigt uns noch, auf den Ausgangspunkt dieser Untersuchungen, die Frage nach der Erklärung der Chlorwanderung im Blute zurückzukommen, und aus den gewonnenen Resultaten dasjenige zusammenzufassen, was zu dieser Erklärung beizutragen geeignet erscheint.

Wie aus früheren Versuchen hervorgeht, nimmt die CO_2 unter anderen Säuren mit der ihr zukommenden Fähigkeit, Chlor in die Erythrocyten zu verdrängen, eine Ausnahmestellung ein, für welche man am ungezwungensten physikalische Eigenschaften der Säure selbst als Ursache ansehen könnte. Dann müßte das Phänomen der Chlorwanderung überall dort zu finden sein, wo CO_2-haltige NaCl-Lösung mit einer von tierischen Membranen eingeschlossenen Menge von teils freien teils an Eiweiß gebundenen fixen Alkalien, wie sie in tierischen Zellen gegeben ist, zusammentrifft.

Die oben mitgeteilten Versuche haben jedoch gezeigt, daß Chlor unter diesen Bedingungen in die Leberzellen nicht wandert. Die Ursache der bei den Erythrocyten beobachteten Chlorwanderung kann somit keine allgemeine, in dem Verhalten der CO_2 allein gelegene sein, sondern es müssen auch bei so einfachen Vorgängen, wie es die Bindung von Säuren und Alkalien ist, wenn sie im Tierkörper sich vollziehen, offenbar lokale, durch Struktur und Zusammensetzung gegebene Verschiedenheiten der einzelnen Zellterritorien für den Ablauf maßgebend sein und einen ver-

schiedenen Ablauf der Reaktionen an verschiedenen Stellen des Organismus bedingen. Die Vorstellung, daß die Erythrocyten ein der Salzsäure und Kohlensäure gegenüber differenziertes Plasma besitzen, stößt noch weniger auf Schwierigkeiten, wenn man die ausgesprochene Differenzierung derselben im Verhalten gegen anisotonische Lösungen bedenkt, und mit den in Abschnitt I wiedergegebenen Erfahrungen an Leberzellen vergleicht.

Um der Art dieser Differenzierung näherzutreten, habe ich anschließend daran zwei orientierende Versuche ausgeführt, welche zeigen sollten, ob der Plasmainhalt der Erythrocyten einen Bestandteil enthält, der die Diffusion der Säuren in diesem elektiven Sinne beeinflußt.

Versuch XXXV. Es wurde defibriniertes Pferdeblut zentrifugiert, der Brei in großen Schalen mit Glassand zerrieben, sodann mit Kochsalzlösung ausgezogen, wobei eine dunkelrote Flüssigkeit erhalten wurde. In derselben wurde der Chlorgehalt ermittelt, und sodann eine denselben Cl-Gehalt aufweisende NaCl-Lösung hergestellt und etwa 500 ccm des Extrakts in einem Dialyseschlauch gegen 668 ccm der gleichkonzentrierten NaCl-Lösung dialysiert, während 1/2 Stunde lang in letztere CO_2 eingeleitet wurde. Der anfängliche Cl-Gehalt betrug 0,5 Proz., nach 1/2-stündiger CO_2-Behandlung 0,6 Proz.

Versuch XXXVI. Ein in derselben Weise mit durch zweimaliges Frieren und Wiederauftauen lackfarben gemachtem Cruor von defibriniertem Pferdeblut, der gegen gleichen Chlorgehalt aufweisende NaCl-Lösung dialysiert wurde, angestellter Versuch ergab nach 1/2-stündigem Einleiten von CO_2 in die Außenflüssigkeit, daß ihr Chlorgehalt (0,43 Proz.) gleichgeblieben war.

Wie man sieht, entspricht bereits die in den beiden Versuchen befolgte Anordnung nicht mehr den Bedingungen, unter denen Chlorwanderung eintritt, trotzdem die chemische Zusammensetzung der Erythrocyten dabei gewiß nicht tiefgreifend verändert worden war. Dadurch wird eine frühere Beobachtung dem Verständnis näher gerückt: die Inkonstanz*) der Chlorwanderung beim Rinderblut im Vergleich zur Konstanz derselben bei anderen Blutsorten (Pferd, Schwein).

Während ein derartiges Verhalten bei einer Erklärung der Chlorwanderung aus dem physikalischen Verhalten der CO_2 allein ganz unverständlich wäre, wird es bei der hier niedergelegten Auffassung erklärlich, ganz besonders mit Rücksicht auf die letzterwähnten Versuche XXXV und XXXVI.

Wenn die vorliegenden Versuche somit noch nicht gestatten, sich über die Art der in Rede stehenden Differenzierungen eine Vorstellung zu bilden, so möchte ich andererseits darauf hin-

*) Siehe meine oben zitierte Untersuchung.

weisen, daß sie Beziehungen derselben zur Zusammensetzung und zum biologischen Verhalten der Organe aufdecken, wie am besten der Vergleich der Chlorarmut der Leber und ihres Verhaltens bei Salzsäurevergiftung mit dem Verhalten der dem Kreislauf entzogenen Leber gegen kohlensäurehaltige Kochsalzlösung zeigt.

Es ist nicht unmöglich, daß das systematische Studium derartiger Verhältnisse an anderen Geweben noch weitere Beispiele von Übereinstimmung zwischen physikalisch-chemischer Eigenart und biologischem Verhalten bieten, und damit weitere Einblicke in die Anteilnahme der durch die lokale Eigenart der Zellterritorien beeinflußten physikalisch-chemischen Kräfte am Zustandekommen der an der lebenden Materie sich abspielenden Vorgänge eröffnen wird.

XVI.

Über Lösung und Quellung von Kolloiden.

Von **K. Spiro.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

I. Wirkung von OH- und H-Ionen auf die Quellung des Leims.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit habe ich zeigen können, daß eine wässerige Lösung von käuflichem kolloidalem Eisenoxyd durch Methylalkohol nicht in merkbarer Weise beeinflußt wird, so daß z. B. die Fällungsgrenze für Chlorkalzium durch Zusatz von Methylalkohol gar nicht geändert wird. Da sich Wasser mit Methylalkohol in jedem Verhältnis mischt, eine echte Lösung bildet, lag es nahe, anzunehmen, daß die kolloidale Lösung keine echte Lösung, sondern nur eine Suspension darstellt, wie dies ja eine Reihe von Forschern bereits vermutet hat.

Der Beweis aber, daß es sich nur um eine Suspension handelt, war natürlich auf diesem Wege nicht erbracht. In der kolloidalen Eisenoxydlösung konnte immerhin etwas in echter Lösung vorhanden sein, etwa wie eine sehr feine Fettemulsion nur möglich ist, wenn ein Teil der hochmolekularen Fettsäuren sich als Seife in Lösung befindet.

Die Entscheidung, daß ein Teil des kolloidalen Eisenoxyds sich in echter Lösung befindet, hat sich auf folgendem Wege erbringen lassen.

Durch die Untersuchungen von F. Hofmeister und W. Pauli haben sich bestimmte Gesetzmäßigkeiten für den Vorgang der Quellung und seine Beeinflussung durch Salze ergeben, die den in der vorigen Arbeit besprochenen Gesetzmäßigkeiten bei der Aussalzung entsprechen. Hofmeister hat zeigen können, daß die Quellung durch Salze wesentlich beschleunigt werden kann,

worauf im folgenden noch einzugehen sein wird. Ungleich wirksamer als Salze zeigten sich mir sowohl Hydroxyl- als auch Wasserstoffionen. Wie außerordentlich Natronlauge auch noch in großer Verdünnung den Quellungsvorgang beeinflußt, mögen folgende Protokolle zeigen.

Tabelle I.

Quellung in	A. Gewicht der Leimscheibe	B. Davon Leim	C. Aufgenommen Wasser	D. Wasseraufnahme auf 1 Teil Leim
I. Wasser	0,9987	0,1602	0,4839	3,021
II. N/10 NaOH	1,0249	0,1644	2,1360	12,61
III. N/50 NaOH	1,0152	0,1628	1,9242	11,82
IV. N/100 NaOH	1,0972	0,1760	0,8945	5,081

Tabelle II.

Quellung in	A. Gewicht der Leimscheibe	B. Davon Leim	C. Aufgenommen Wasser	D. Wasseraufnahme auf 1 Teil Leim
I. Wasser	1,0849	0,1741	0,6047	3,473
II. N/200 NaOH	1,1361	0,1823	0,7808	4,285
III. N/500 NaOH	1,1362	0,1823	0,6230	3,419

Noch stärker wirksam erwiesen sich mir verdünnte Säuren, wofür folgende Tabelle ein Beispiel gibt:

Tabelle III.

Quellung in	A. Gewicht der Leimscheibe g	B. Davon Leim g	C. Aufgenommen Wasser g	D. Wasseraufnahme auf 1 Teil Leim
I. Wasser	1,223	0,1802	0,3550	1,97
II. N/200 HCl	1,250	0,1843	1,0037	5,45
III. N/500 HCl	1,179	0,1737	0,6060	3,49

II. Wirkung von kolloidaler Eisenoxydlösung auf die Quellung des Leims.

a) In Wasser.

An die Möglichkeit, daß etwa in Lösung vorhandenes Hydroxyd des dreiwertigen Eisens die Quellung begünstigte, konnte man um

so eher denken, als nach den Untersuchungen Paulis das zweiwertige Kation Magnesium weniger ausfällend auf Eiweißkörper wirkt, als die einwertigen Alkaliionen und im allgemeinen mit der Zunahme der Wertigkeit eine Begünstigung des Quellungsgrades zu erkennen ist.

Die außerordentliche Quellungsbeschleunigung, die käufliches kolloidales Eisenoxyd hervorruft, zeigen folgende zwei Versuche.

Tabelle IV.

Quellung in	A. Gewicht der Leimscheiben g	B. Leimgehalt g	C. Quellungsdauer Std.	D. Gesamtmenge der imbibierten Flüssigkeit g	E. Davon Wasser ursprüngl. vorhanden g	F. Davon Wasser neuaufgenommen g	G. Wasseraufnahme auf 1 Teil Leim
Ia. Wasser	0,9237	0,1486	20	1,2953	0,7751	0,5202	3,501
IIa. 5proz. koll. Eisenoxyd	1,1350	0,1826	20	3,8125	0,9524	2,8480	15,60
Ib. Wasser	1,0484	0,1686	22	1,4034	0,8798	0,5236	3,106
IIb. 5proz. koll. Eisenoxyd	1,2514	0,2013	22	3,9333	1,0501	2,8746	14,29

b) In Salzlösungen.

Es war nun von Interesse, den Einfluß der kolloidalen Lösung zu untersuchen, wenn die Quellung nicht in reinem Wasser, sondern in der Lösung eines indifferenten Stoffes stattfand. Hofmeister hat nachgewiesen, daß durch Anwesenheit von Salzen und indifferenten Stoffen die Wasseraufnahme erheblich begünstigt ist, so daß es zu einer stärkeren Quellung kommt als in reinem Wasser. Verwendet man höhere Konzentrationen an Salz, so kommt es leicht zu einem Zerfließen der Leimscheiben (Bildung von Additionsprodukten); nach meinen Versuchen scheinen namentlich die löslichen Ca-Salze so zu wirken. Ich habe daher an Stelle der Elektrolyte vielmehr Nichtelektrolyte angewandt, die ebensowenig die Leimscheiben zum Zerfließen bringen, wie sie Leimfällungsmittel sind.

Den Einfluß von Traubenzuckerlösungen auf die Quellung von Leimscheiben mag folgendes Protokoll darstellen.

Tabelle V.

Quellung in 16 ccm	A. Gewicht der Leimscheiben g	B. Leimgehalt g	C. Quellungsdauer	D. Gesamtmenge der imbibierten Flüssigkeit g	E. Davon Wasser ursprünglich vorhanden g	F. Davon Wasser neu aufgenommen g	G. Wasseraufnahme auf 1 Teil Leim	H. Glykose aufgenommen g	I. Konzentration der imbibierten Lösung in Proz.	K. Mittl. Konzentration der neu aufgenommenen Lösung in Proz.
I. Wasser	1,2895	0,1901	20 Stunden	1,6601	1,0994	+ 0,5607	2,9	—	—	—
II. 0,8 proz. Glykoselösung	1,2493	0,1842		1,5925	1,0651	+ 0,5176	2,8	0,0098	0,61	1,9
III. $1\frac{9}{16}$ proz. Glykoselösung	1,3308	0,1962		1,6779	1,1346	+ 0,5288	2,7	0,0145	0,86	2,7
IV. $3\frac{1}{8}$ proz. Glykoselösung	1,0061	0,1483		1,4198	0,8578	+ 0,5065	3,4	0,0555	3,91	10,9
V. $6\frac{1}{4}$ proz. Glykoselösung	1,3236	0,1951		1,6552	1,1285	+ 0,4348	2,2	0,0919	5,55	21,1
VI. $12\frac{1}{2}$ proz. Glykoselösung	1,0661	0,1575		1,4345	0,9086	+ 0,3704	2,3	0,1555	11,09	42,0
VII. 25 proz. Glykoselösung	1,1580	0,1707		1,3044	0,9873	+ 0,0560	0,3	0,2611	20,02	466,2
VIII. 50 proz. Glykoselösung	1,1673	0,1721		0,8597	0,9952	− 0,4763	—	0,3408	39,63	∞

Wir sehen, daß optimale Quellung nicht in reinem Wasser stattfindet, sondern in einer etwa 3proz. Glykoselösung; bei einem Gehalt von 25 Proz. Glykose ist die Wasseraufnahme fast gleich Null, bei noch höherem Gehalt schrumpft die Platte unter reichlicher Wasserabgabe. Auf die Deutung dieser Befunde wird noch weiter unten einzugehen sein.

Ebenso wie die Quellung in reinem Wasser wird nun auch die in Zuckerlösungen durch die Gegenwart von kolloidalem Eisenoxyd beeinflußt.

Bei den folgenden Versuchen bin ich zuerst von der Hofmeisterschen Versuchsanordnung in sofern abgewichen, als ich statt der Leimscheiben eine in einem großen Uhrglas befindliche Leimschicht anwandte. Doch möchte ich im allgemeinen nach meinen Erfahrungen die Anwendung von Leimscheiben mehr empfehlen, da die Versuche so ökonomischer und genauer durchführbar sind.

Tabelle VI.

Leimschicht, ein Mittel 9,8109 g schwer mit 0,7208 g Trockengewicht.
Versuchsdauer 24 Stunden.

Leim überschichtet mit	A. Gesamtmenge der imbibierten Flüssigkeit g	B. Davon Wasser ursprüngl. vorhanden g	C. Davon Wasser neu aufgenommen g	D. Zucker aufgenommen	E. Konzentration der imbibierten Lösung in Proz.	F. Mittlere Konzentration der aufgenommenen Zuckerlösung in Proz.
I. 2½ proz. koll. Eisenoxyd	16,3912	9,0901	7,3011	—	—	—
II. Mischung von gleichen Teilen 5 proz. koll. Eisenoxyd und 10 proz. Glykoselösung	a) 15,1222	8,4961	6,2531	0,3630	2,46	5,80
	b) 15,6481	8,8858	6,3857	0,3766	2,47	5,90
III. 5 proz. Glykoselösung	11,1903	9,1328	1,7765	0,2710	2,48	15,26

Leimschicht, im Mittel 9,64503 g schwer mit 0,7227 g Trockengehalt.
Versuchsdauer 20 bzw. 24 Stunden.

Leim überschichtet mit	A. Gesamtmenge der imbibierten Flüssigkeit g	B. Davon Wasser ursprüngl. vorhanden g	C. Davon Wasser neu aufgenommen g	D. Zucker aufgenommen	E. Konzentration der imbibierten Lösung in Proz.	F. Mittlere Konzentration der aufgenommenen Zuckerlösung in Proz.
Ia. 2½ proz. koll. Eisenoxyd	14,2390	9,1250	5,1140	—	—	—
IIa. Mischung von gleichen Teilen 5 proz. koll. Eisenoxyd und 10 proz. Glykoselösung	14,1427	9,1188	4,7613	0,2526	1,82	5,31
IIIa. 5 proz. Glykoselösung	10,6272	9,1370	1,3195	0,1707	1,60	13.0
Ib. 2½ proz. koll. Eisenoxyd	14,1142	9,1733	4,9409	—	—	—
IIb. Mischung von gleichen Teilen 5 proz. koll. Eisenoxyd und 10 proz. Glykoselösung	14.0038	9,1070	4,6143	0,2525	1,83	5,43
IIIb. 5 proz. Glykoselösung	10,5471	9.0661	1,3012	0,1978	1,73	13,8

Auch in diesen Versuchen tritt die Quellungsbeschleunigung durch das kolloidale Eisenoxyd deutlich zutage: dabei wird im wesentlichen die Wasseraufnahme begünstigt; denn wenn auch die absolute Menge des aufgenommenen Zuckers gesteigert ist, so zeigen doch die beiden letzten Spalten, daß die Konzentration der aufgenommenen Zuckerlösung bedeutend geringer ist, die Steigerung der aufgenommenen Zuckermenge also darauf zurückzuführen ist, daß sehr viel mehr einer verdünnteren Lösung in die Leimschicht eindringt.

III. a) Einwirkung anderer Kolloide auf die Quellung des Leims.

Zeigten diese Versuche somit übereinstimmend eine Zunahme der Quellung bei Gegenwart von kolloidalem Eisenhydroxyd, so war es doch nötig, die Versuche auch mit anderen Kolloiden anzustellen. Zunächst seien die Versuche mitgeteilt, die ich mit echten Kolloiden wie Arsentrisulfid, Kaseinlösungen und Milch angestellt habe.

Tabelle VII.

Quellung in	A. Gewicht der Leimscheiben g	B. Quellungsdauer Std.	C. Leimgehalt g	D. Gesamtmenge der imbibierten Flüssigkeit g	E. Davon Wasser ursprüngl. vorhanden g	F. Davon Wasser neu aufgenommen g	G. Wasseraufnahme auf 1 Teil Leim
Ia. Wasser	0,9237	20	0,1486	1,2953	0,7751	0,5202	3,501
Ib. As_2S_3-Lösung	0,9890	20	0,1591	1,3777	0,8299	0,5442	3,422
IIb. Wasser	1,0484	22	0,1686	1,4034	0,8798	0,5236	3,106
IIb. As_2S_3-Lösung	1,0469	22	0,1684	1,4131	0,8785	0,5305	3,151

Tabelle VIII.

Quellung in	A. Gewicht der Leimscheibe g	B. davon Leim g	C. Quellungsdauer	D. Aufgenommen Wasser	E. Verhältnis zum vorhandenen Leim
I. Wasser	1,0849	0,1741	24 Std.	0,6047	3,473
II. Kaseinlösung	1,2328	0,1979	„	0,4427	2,24
III. dialysierter Milch	1,2877	0,2063	„	0,6649	3,23

Gegenwart von echten Kolloiden an sich hat also keinen Einfluß auf die Quellung von Leim; anders dagegen verhalten sich die Lösungen der Serumeiweißstoffe, wie aus folgenden Protokollen hervorgeht.

Tabelle IX.

Leimschicht im Mittel 9,645 g mit 0,7227 Trockengewicht.

Überschichtet mit gleichen Teilen von	A. Gesamtmenge der imbibierten Flüssigkeit g	B. Davon Wasser ursprüngl. vorhanden g	C. Davon Wasser neu aufgenommen g	D. Zucker aufgenommen g	E. Konzentration d. imbibiert. Lösung in Proz.	F. Mittlere Konzentrat. d. aufgenomm. Lös. i. Proz.
Ia. Pferdeserum u. Wasser	9,5514	8,7755	0,7759	—	—	—
IIa. Pferdeserum u. 10 proz. Glykose	9,3610	8,6688	0,4871	0,2051	2,19	42,11
IIIa. 10 prz. Glykoselösg. u. Wasser	10,2869	8,7185	1,3767	0,1971	1,86	13,9
Ib. Pferdeserum u. Wasser	9,4527	8,6693	0,7834	—	—	—
IIb. Pferdeserum u. 10proz. Glykoselösung	9,3776	8,6804	0,4812	0,2160	2,30	56,51
IIIb. 10prz. Glykoselösg. u. Wasser	10,2987	8,7053	1,3995	0,1939	1,86	13,7
Ic. 60prz. Glykoselösung	7,2299	8,8909	— 3,6106	1,9496	28,84	—
IIc. 60prz. Glykoselösg. u. Wasser	9,1199	8,9603	— 1,0615	1,2212	13,39	—
IIIc. 60prz. Glykoselösg. u. Pferdeserum	8,9667	8,8966	— 1,3626	1,4327	15,98	—
IVc. 60prz. Glykoselösg. u. 5prz. koll. Eisenoxyd	13,8501	8,9656	+ 2,6204	2,2641	16,35	86,4
IId. 60prz. Glykoselösg. u. Wasser	9,0035	8,9508	— 1,2126	1,2653	14,06	—
IIId. 60prz. Glykoselösg. u. Pferdeserum	9,1322	8,9300	— 1,2624	1,4646	16,04	—
IVd. 60prz. Glykoselösg. u. 5prz. koll. Eisenoxyd	13,9390	8,9246	+ 2,8399	2,1745	15,60	76,7

Tabelle X.

Quellung in (gleichen Teilen)	A. Gewicht der Leimscheiben g	B. Leimgehalt g	C. Quellungsdauer Std.	D. Gesamtmenge der imbibierten Flüssigkeit g	E. Davon Wasser ursprüngl. vorhanden g	F. Davon Wasser neu aufgenommen g	G. Zucker aufgenommen g	II. Konzentration der imbibierten Lösung in Proz.	I. Mittlere Konzentration der neu aufgenommenen Lös. i. Proz.
I. 60proz. Glykoselösung	1,1862	0,1903	24	0,9684	0,9959	− 0,3484	0,3209	33,13	
IIa. 30proz. Glykoselösung	1,1520	0,1848	„	1,3957	0,9672	+ 0,1638	0,2647	18,96	161,5
IIb. 60proz. Glykoselös. u. Pferdeserum	1,1598	0,1861	„	1,5072	0,9787	+ 0,2223	0,3112	20,65	143,2
IIc. 60proz. Glykoselösung u. 5proz. koll. Eisenoxyd	1,0920	0,1751		2,8580	0,9169	+ 1,3770	0,5641	19,74	40,97
IIIa. 30proz. Glykoselösung	1,0874	0,1744	22	1,3658	0,9130	+ 0,2579	0,1949	18,88	132,3
IIIb. 60proz. Glykoselös. u. Pferdeserum	1,0738	0,1723	„	1,4518	0,9015	+ 0,2518	+ 0,2985	20,56	118,5
IIIc. 60proz. Glykoselös. u. 5proz. koll. Eisenoxyd	1,1342	0,1820	„	2,9860	0,9522	+ 1,4614	0,5724	19,18	39,16
IVa. 5proz. Glykoselösung	1,1827	0,1879	24	1,5600	0,9948	+ 0,5151	0,0501	3,211	9,72
IVb. 10proz. Glykoselös. u. 5proz. koll. Eisenoxyd	1,0458	0,1677	„	4,7155	0,8776	+ 3,6653	0,1726	3,66	4,71
IVc. 10proz. Glykoselösung u. Serum	1,0243	0,1643	„	1,6701	0,8600	+ 0,7491	0,0610	3,65	8,14
IVd. 5proz. koll. Eisenoxyd u. Wasser	1,1691	0,1875	„	5,1068	0,9816	+ 4,1252	—		
IVe. Serum u. Wasser	1,0326	0,1656	„	1,6957	0,8670	+ 0,8287	—		
Va. 5proz. Glykoselösung	1,0781	0,1730	20	1,4589	0,9051	+ 0,5129	0,0419	2,87	8,17
Vb. 10proz. Glykoselös. u. 5proz. koll. Eisenoxyd	1,4873	0,2386	„	4,7478	1,2487	+ 3,3707	0,1284	2,70	3,81
Vc. 10proz. Glykoselösung u. Serum	1,2183	0,1954	„	1,8221	1,0229	+ 0,7503	0,0489	2,68	8,14
Vd. 5proz. koll. Eisenoxyd u. Wasser	1,0708	0,1718	„	4,8638	0,8990	+ 3,9648	—		
Ve. Serum u. Wasser	1,0413	0,1670	„	1,6760	0,8743	+ 0,8017	—		

Die vorstehenden Versuche zeigen, daß auch das Serum ebenso wie die Milch nicht die Quellung von Leim begünstigt; vergleicht man sie mit dem kolloidalen Eisenhydroxyd oder mit verdünnten Säuren bzw. Alkalien, so kann man hierin eine Bestätigung dafür sehen, daß die beiden tierischen Flüssigkeiten, obgleich sie eine große Basen- und Säurekapazität haben, d. h. Basen und Säuren binden können, doch eigentlich weder alkalisch noch sauer reagieren.

Von dem Serum läßt sich sogar in einigen Versuchen zeigen, daß es die Quellung der Leimschicht hindert, dabei aber die Zuckeraufnahme begünstigt. Das hat zum Teil schon Oker-Blom gefunden und in einer soeben erschienenen Arbeit mitgeteilt. Sein Hauptversuch ist der, daß er eine gequollene Leimschicht teils mit nativem Serum, teils mit solchem, das „durch genügendes Erwärmen von dem größten Teil seiner Eiweißkörper befreit ist", zusammenbringt; er findet dann die Gewichtszunahme bei Überschichtung mit eiweißfreiem Serum größer, als bei Überschichtung mit normalem Serum, z. B. 2,104 g gegen 0,773 g. Die Versuchsanordnung ist, wie man sieht, nicht einwandsfrei, da beim Erwärmen des nativen Serums natürlich auch chemische Umsetzungen stattfinden, Abspaltung von H_2S, Bildung von Alkalialbuminat, Umwandlung von Albuminen in Globuline (Moll); immerhin stehen seine Versuche mit meinen aus Tabelle IX in Einklang, während die aus Tabelle X ein anderes Resultat geben. Offenbar sind für die Quellung die Eiweißkörper nicht von solcher Bedeutung wie die Salze.

Oker-Blom nimmt freilich an, daß die Kristalloide mit solcher Leichtigkeit und Schnelligkeit in das Gelee eindringen, daß sie „binnen einiger Zeit auf das ganze Gebilde gleichmäßig verteilt sind und ihre osmotische Bedeutung für die Gewichtsänderungen des Gelees einbüßen." Meine oben mitgeteilten Erfahrungen — auch die Versuchszeit Oker-Bloms beträgt höchstens 24 Stunden — weisen darauf hin, daß die Diffusionsgeschwindigkeit in Gallerten doch erheblich niedriger ist, als dies Oker-Blom annimmt. Die Salze des Serums müssen daher bei der Bestimmung der osmotischen Leistungen wohl berücksichtigt werden; dies geht ganz besonders noch aus den folgenden Versuchen hervor, die zeigen, daß in salzfreiem Serum Leim erheblich weniger quillt, als in dem nativen Serum. Aus dem nativen Serum wurden ungefähr 1 bis 2 cg fester Bestandteile aufgenommen.

(Siehe Tabelle XI auf folgender Seite.)

Daß die Entfernung der anorganischen Bestandteile und ebenso die Erwärmung auf 60° die Wirkung des Serums auf die Quellung erheblich beeinflußt, zeigen die Zahlen der Spalte G.

Tabelle XI.

Quellung in	A. Gewicht der Leimscheiben g	B. Quellungsdauer Std.	C. Leimgehalt g	D. Gesamtmenge der imbibierten Flüssigkeit g	E. Davon Wasser ursprüngl. vorhanden g	F. Davon Wasser neu aufgenommen g	G. Wasseraufnahme auf ein Teil Leim
Ia. Wasser	0,9237	22	0,1486	1,2953	0,7751	0,5202	3,501
Ib. Pferde-Serum nativ	1,1339	22	0,1824	1,6532	0,9515	0,6939	3,805
Ic. Pferde-Serum dialysiert	1,1183	22	0,1798	1,4287	0,9385	0,4902	2,733
Id. Pferde-Serum auf 58 bis 60° erhitzt	1,0030	22	0,1610	1,5711	0,8420	0,7005	4,351
IIa. Wasser	1,0484	20	0,1686	1,4034	0,8798	0,5236	3,106
IIb. Pferde-Serum nativ	1,1598	20	0,1865	1,6875	0,9733	0,6908	3,711
IIc. Pferde-Serum dialysiert	1,2650	20	0,2036	1,5613	1,0614	0,4999	2,456
IId. Pferde-Serum auf 58 bis 60° erhitzt	1,0075	20	0,1620	1,5614	0,8455	0,6884	4,250

b) Vergleich des Leims mit anderen quellbaren Körpern.

Kurz erwähnen möchte ich hier noch Versuche, die zeigen, daß die verschiedenen quellbaren Körper sich derselben Substanz gegenüber ganz verschieden verhalten: so quellen Agarplatten viel weniger als Leimplatten, und von der Hornhaut ließ sich sogar zeigen, daß sie in kolloidaler Eisenoxydlösung sogar fast viermal weniger quillt als in reinem Wasser. (Verhältnis der Wasseraufnahme pro Gewichtseinheit Hornhaut in reinem Wasser zu der in kolloidaler Eisenoxydlösung ist gleich 36,00 : 9,44, bzw. 29,03 : 7,43.)

IV. Quellung und osmotischer Druck.

Die bisherigen Versuche zeigen, daß es Substanzen gibt, die die Quellung von Gelatine in Wasser begünstigen, während andere hemmend wirken, andere wiederum ohne Einfluß sind. Läßt sich für diese Erscheinungen ein allgemeines Gesetz aufstellen,

etwa so wie das Wasseranziehungsvermögen der durch eine semipermeable Membran eingeschlossenen Substanzen dem Molekulargewicht entspricht?

Ein Vergleich mit den Erscheinungen des osmotischen Drucks liegt nahe, und Oker-Blom hat, wie wir gesehen haben, durch seine Quellungsversuche den direkten Beweis für die osmotische Wirksamkeit der Serumeiweißkörper zu bringen gedacht. Die Quellung in Salzlösungen kann aber meiner Ansicht nach nicht mit den Erscheinungen der Osmose verglichen werden. Bei diesen haben wir zu beiden Seiten der Membran ein gleichartiges Medium, z. B. in den bekannten Pfefferschen Versuchen zu beiden Seiten der Ferrocyankupfermembran Wasser, bzw. Wasser und wässerige Zuckerlösung, d. h. zwei miteinander in allen Verhältnissen mischbare Flüssigkeiten. Gequollener Leim und Salz- oder Eiweißlösungen sind aber, wie in der vorigen Mitteilung ausführlicher erörtert, nicht in allen Verhältnissen miteinander mischbar. Infolgedessen können hier nicht einfache „osmotische“ Verhältnisse maßgebend sein.

Dies zeigt neben anderen Zahlen obiger Versuche vor allem Tabelle V. Die etwa 16proz. Leimlösung nimmt kein Wasser auf aus einer ungefähr 25proz. Traubenzuckerlösung; die dargebotene Traubenzuckermenge betrug etwa 4 g, so daß in der äußeren Lösung nach der Diffusion etwa 3,739 g in 15,95 g Wasser waren, d. h. eine etwa 23,5proz. Lösung. Wenn die in die Leimscheibe hineindiffundierten 0,2611 g auch in derselben Konzentration gelöst wären, so wäre durch sie 1,114 g Wasser in Beschlag genommen, während nur 1,0433 g vorhanden ist.

Noch schlagender ist, daß bei höherer Konzentration an Zucker eine Entquellung des Leims zustande kommt, trotzdem der Zucker in die Leimscheibe hineindiffundieren kann.

Auch die Erfahrung, daß geringe Beimengungen von Stoffen einen so starken Einfluß auf die Quellung haben, ist mit einfachen osmotischen Verhältnissen nicht zu erklären.

Wenn wir nun berücksichtigen, daß Wasser und Leim ein heterogenes System darstellen, so wird es verständlich, warum hier nicht ausschließlich osmotische Verhältnisse gelten. Der osmotische Druck zweier Stoffe wird in einem homogenen System, z. B. Wasser, ihrem Molekulargewicht entsprechen; machen wir das System durch Zufügung eines mit Wasser nicht in allen Verhältnissen mischbaren Körpers, z. B. Äther, heterogen, so wird die Konzentration der beiden Stoffe in der Ätherschicht nicht mehr ihrem Molekulargewicht entsprechen, sondern dem

Grade ihrer Ausätherbarkeit, bzw. ihrer „Lösungsaffinität" zu den beiden Lösungsmitteln, d. h. in heterogenen Systemen gilt nicht der osmotische Druck sondern der Verteilungssatz!

V. Die Rolle gelöster Stoffe in kolloidalen Lösungen.

Daß in den Kolloidlösungen zum Teil auch gelöste Stoffe vorhanden sind, wird nach dem Grundsatz: corpora non agunt nisi fluida — durch nichts besser bewiesen, als durch ihre Lösungs- bzw. Reaktionserscheinungen.

Die gesteigerte Quellbarkeit von Leim in kolloidalen Eisenoxydlösungen haben wir oben ausführlich gezeigt. Kleinste Quantitäten gelöster Kieselsäure kann man durch Niederschlagsbildung mit Leimlösungen nachweisen, ebenso findet, wenn man kolloidales Eisenoxyd mit salzfreier Leimlösung zusammenbringt, eine Entmischung der Eisenoxydlösung statt, die leicht reversibel ist. Auch fällt Eisenoxydlösung sofort Kieselsäure aus. Wie Eisenoxyd wirken Aluminiumhydroxyd und Chromhydroxyd, wie Kieselsäure wirken Zinnsäure und Molybdänsäure, d. h. es besteht ein Gegensatz zwischen basischen und sauren, zwischen den nach der Kathode und den nach der Anode wandernden Substanzen.

Nun widerspricht es allerdings der üblichen Auffassung, daß Körper, wie das ganz unlösliche Eisenhydroxyd oder die ganz unlösliche Kieselsäure in Wasser löslich sein könnten. Für die kolloidale Kieselsäure läßt sich nun leicht durch Flammenreaktion zeigen, daß sie in ihrer Lösung immer durch Dialyse nicht fortschaffbares Natrium enthält (Jordis und Kanter).

Ebenso kann man für die kolloidale Eisenoxydlösung zeigen, daß sie nicht nur eine Suspension von $Fe(OH)_3$, sondern ein Gemenge darstellt. Sie enthält ionisiertes und nicht ionisiertes Cl, denn es läßt sich aus ihr nicht alles Cl direkt mit Silbernitrat ausfällen (Hantzsch), auch der durch Salzfällung gewonnene, sorgfältig ausgewaschene „Eisenhydroxyd"-Niederschlag enthält immer noch Chlor, das aber erst durch Schmelzen mit Soda nachweisbar ist.

In einem käuflichen Präparat waren 85,9 Proz. des gesamten Chlor ionisiert, durch Dialyse nahm der ionisierte Anteil erheblich ab (mehr als der nichtionisierte), bis auf 51 Proz., während in einem anderen Präparat das ionisierte Chlor von vornherein nur 52,6 Proz. des Gesamtchlors betrug.

Auch bei Monate langer Dialyse enthält das Präparat beide Formen des Chlor, während im Dialysat (fast) nur ionisiertes Chlor vorhanden ist.

Daß das „kolloidale Eisenhydroxyd" eine sehr komplizierte Zusammensetzung hat, wird endlich durch folgende Analysen von zwei Präparaten bewiesen, von denen das erste (I) wochen-, das zweite (II) monatelang gegen destilliertes Wasser dialysiert war. Beide Präparate zeigten keine saure Reaktion mehr, der Chlorgehalt kann also nicht auf etwa durch Hydrolyse entstandene Salzsäure bezogen werden.

Tabelle XII.

	Gefunden		Berechnet für		
	I	II	$FeCl_3$	$Fe(OH)_3$	Fe_2O_3
Fe	57,37	64,11	34,44	52,27	69,96
Cl	7,63	4,55	65,56	—	—
(OH)	35,00	31,34	—	47,73	—
O			—	—	30,04

Ein einfaches Gemenge von $FeCl_3$ und $Fe(OH)_3$ kann nicht vorliegen, denn wenn wir annehmen, die 4,55 bzw. 7,63 Proz. Cl seien an Fe als $FeCl_3$ gebunden, so entspricht das 2,39 bzw. 4,01 Proz. Fe, es bleiben dann noch in 100 g Trockensubstanz 93,06 bzw. 88,36 g Rückstand, die 61,72 bzw. 53,36 g Fe enthalten, d. h. 66,34 bzw. 60,39 Proz. Fe, gegenüber 52,27 Proz. Fe des $Fe(OH)_3$, von dem sich also wohl mehrere Moleküle kondensiert haben.

Aus diesen Analysen geht mit Sicherheit hervor, daß das kolloidale Eisenhydroxyd keine einfache Verbindung ist, sondern eine komplizierter gebaute Substanz*) oder, was viel wahrscheinlicher, ein Gemenge, dessen Erforschung außerhalb des Rahmens dieser Arbeit liegt. Die Analysen zeigen uns aber gleichzeitig, daß von den in der kolloidalen Eisenhydroxydlösung enthaltenen Substanzen die eisenärmere leicht diffusibel, die andere, die eisenreichere, schwer diffusibel ist.

Die wirklich gelösten Stoffe sind in einer kolloidalen Eisenoxydlösung in sehr geringer Menge vorhanden gegenüber den nur suspendierten, wie durch Filtration, Aussalzung usw. quantitativ gezeigt werden kann. Es ist nun von Wichtigkeit, daß sich nach-

*) Es mag hervorgehoben werden, daß zur Bildung kolloidaler Lösungen meist solche Verbindungen geeignet sind, die sowohl Säuren als Basen zu bilden imstande sind (Fe, Si, As), die also gewissermaßen wie die Aminosäuren und Eiweißstoffe amphotere Elektrolyte sein können. Vielleicht beruht hierauf die Möglichkeit der Bildung größerer Molekularkomplexe.

weisen läßt, daß Eigenschaften und Beständigkeit der kolloidalen Suspension abhängig sind von der Gegenwart der diffusiblen Substanz.

Dies wird bewiesen durch folgende Tatsachen:

1. Mit der Dauer der Dialyse nimmt beim kolloidalen Eisenoxyd die saure Reaktion (nachweisbar im Filtrat der Neutralsalzfällung) ab. Vielleicht ist dies der Grund, daß

2. die dialysierte kolloidale Eisenoxydlösung Leimplatten sehr viel weniger zum Quellen bringt, als das käufliche Präparat*), Vgl. Tabelle XIII.

3. Das dialysierte Präparat wird viel leichter zum Ausfällen gebracht als das käufliche: Zum Fällen von 2 ccm des letzteren brauchte ich 2 ccm einer 10proz. Kalziumchloridlösung, des ersteren aber nur 2 Tropfen; ebenso zur Fällung einer auf das doppelte verdünnten nativen Eisenoxydlösung 3,1 ccm, der dialysierten nur 0,15 ccm der Chlorkalziumlösung. Dabei fällt das gut dialysierte Präparat nicht in Form von Flocken, sondern ganz gelatinös aus, so daß das Glas umgedreht werden kann, ohne daß die Flüssigkeit ausfließt. Durch ganz geringe Quantitäten Salzsäure kann die Entmischung wieder rückgängig gemacht werden.

4. Gut dialysierte kolloidale Eisenoxydlösung kann durch anhaltendes Schütteln mit sorgfältig gereinigtem, von löslichen Salzen freiem Talk zur Ausfällung (Entquellung) gebracht werden, während dies bei einem nicht genügend dialysierten Präparat nicht gelingt.

Für das Bestehenbleiben kolloidaler Suspensionen ist also in dem angeführten Fall, und nach Literaturangaben auch in anderen, die Gegenwart gelöster Körper eine Bedingung, wobei gelöster und suspendierter Körper nicht dieselbe Substanz zu sein braucht. Dasselbe gilt für das Zustandekommen der kolloidalen Suspensionen: Nur so ist es zu verstehen, daß minimale Mengen von Elektrolyten zur Herstellung von Hydrosolen nötig sind: es können z. B. kleine Quantitäten Alkali die Hydrogele der Kieselsäure und Zinnsäure

*) Eisenchloridlösungen lassen Leimplatten kolossal quellen; da sie unter Bildung von Salzsäure hydrolysiert werden, ist die Quellung wohl auf die Säure zurückzuführen, zumal die nicht hydrolysierenden Chloride der ein- und zweiwertigen Metalle nicht entfernt so stark quellungsbegünstigend wirken. Ebenso ist wohl die stark fällende Wirkung der Chloride der dreiwertigen Kationen (Schneider) auf Hydrolyse und Säurebildung zurückzuführen: Quellung und Ausflockung sind, wie weiter unten gezeigt werden wird, qualitativ gleiche Vorgänge mit umgekehrten Vorzeichen.

Tabelle XIII.

Quellung in Mischung von Teilen	A. Gewicht der Leimscheiben g	B. Quellungsdauer	C. Leimgehalt g	D. Gesamtmenge der imbibierten Flüssigkeit g	E. Davon Wasser ursprünglich vorhanden g	F. Davon Wasser neu aufgenommen g	G. Wasseraufnahme auf 1 Teil Leim
1 käufl. koll. Eisenoxyd 0 Wasser	1,1097	24 Std.	0,1635	3,2492 *)	0,9462	2,3030	14,08
1 dialys. " " 0 "	1,1234	" "	0,1656	1,7481 *)	0,9578	0,7903	4,773
1 käufl. " " 1 "	1,1343	" "	0,1672	4,3531 *)	0,9671	3,3800	20,16
1 dialys. " " 1 "	1,1462	" "	0,1685	1,7087	0,9777	0,7310	4,340
1 käufl. " " 3 "	1,1162	" "	0,1645	4,9071	0,9517	3,9554	24,04
1 dialys. " " 3 "	1,1325	" "	0,1669	1,4873	0,9656	0,5217	3,934
1 käufl. " " 7 "	1,1814	" "	0,1742	4,3416	1,0072	3,3344	19,14
1 dialys. " " 7 "	1,1334	" "	0,1670	1,4655	0,9664	0,4991	2,987
1 käufl. " " 15 "	1,1575	" "	0,1706	2,1725 *)	0,9869	1,1856	6,95
1 dialys. " " 15 "	1,0016	" "	0,1476	1,2864	0,8540	0,4324	2,929
1 käufl. " " 31 "	1,2207	" "	0,1799	2,3019	1,0408	1,2611	7,01
1 dialys. " " 31 "	1,1865	" "	0,1750	1,5101	1,0115	0,4986	2,85
0 " " 1 "	1,1895	" "	0,1754	1,5473	1,0141	0,5332	3,04

*) Teilweiser Zerfall der Leimscheiben!

kolloidal lösen [verflüssigen]*). Ebenso wirken Säuren auf kolloidales Eisenoxyd und Leim (amphotere Körper auf Eiweißstoffe). Man muß wohl annehmen, daß durch Wechselwirkung von Säure und Base ein lösliches (kolloidales) Salz entsteht, das das unlösliche Kolloid in Lösung halten kann. Wie sehr ein unbeständiges Kolloid durch die Gegenwart eines zweiten in seinen Eigenschaften verändert und geeignet werden kann, ein beständiges Hydrosol zu liefern, dafür ist der Cassiussche Goldpurpur, die Mischung von Gold und Zinnsäure, das klassische Beispiel. Daß diese gegenseitige Löslichkeit und Beeinflussung von Kolloiden auch bei ganz heterogenen Körpern zutrifft, dafür möchte ich anführen, daß ich fand, daß die Koagulation einer Lösung von kristallisiertem Eieralbumin durch kolloidale Lösungen von Eisenhydroxyd oder Kieselsäure verhindert werden kann.

VI. Kolloidale Lösung und Quellung.

Wie es nun zu erklären ist, daß die Gegenwart eines gelösten Kolloids die Suspension begünstigt, ob Potentialdifferenz oder Oberflächenspannung hierfür ausreicht, wird erst sichergestellt werden können, wenn die physikalische und chemische Natur der suspendierten Körperchen, — die von den einen als flüssig (Quincke), von anderen als fest angesehen werden — genauer bekannt ist.

In der vorhergehenden Arbeit ist gezeigt worden, daß die durch Salze ausgefällten Flocken, das Gel, stets wasserhaltig sind, die suspendierten Teile werden also erst recht wasserhaltig sein, d. h. kapillar (Adsorption, van Bemmelen) oder, was mir wahrscheinlicher ist, molekular (Quellung) Wasser gebunden enthalten. Die für den Physiologen in Betracht kommenden Kolloide sind alle quellbar. Diese Quellung findet mit einem enormen Druck statt (Rodewald), wir haben also eine Quellungsintensität (Aufnahme von Wasser durch die quellbare Substanz), die der Lösungsintensität (Aufnahme der löslichen Substanz in Wasser) an die Seite zu setzen ist, und daher der Entmischung bzw. Abscheidung einen starken Widerstand entgegensetzt. Dem entspricht ja auch, daß in verdünnteren Lösungen die Aussalzung relativ mehr Salz erfordert, als in konzentrierteren. Wenn sich nun die Kolloide mit der Außenflüssigkeit durchtränkt haben — und wie wirksam die Anwesenheit auch geringer Mengen, z. B. Spuren von Säure

*) Der von Graham hierfür gebrauchte Ausdruck „Peptisieren“ erscheint sehr passend, da es sich bei Prozessen wie z. B. der Alkalialbuminatbildung offenbar um ganz ähnliche Vorgänge handelt.

für die Quellbarkeit ist, wurde oben gezeigt*) — so wird ihr spezifisches Gewicht von dem der Außenflüssigkeit so wenig different sein, daß zumal bei viscösen Lösungen eine haltbare Suspension ermöglicht ist.

VII. Kolloide und osmotischer Druck. Über die Abgrenzung der Kolloide von den Kristalloiden.

Auf dem Wege der Quellungsversuche wird man also nicht bestimmen können, ob Kolloidlösungen einen osmotischen Druck ausüben oder nicht. Die Frage fällt mit der anderen zusammen: bilden die Kolloide auch echte Lösungen oder nur Suspensionen?

Daß manche kolloidalen Lösungen nicht mit den homogenen Lösungen gleichzustellen sind, daran kann heute nicht mehr gezweifelt werden; für die meisten von ihnen hat sich zeigen lassen, daß sie beim Passieren durch geeignete Filter (Chamberland-, Pukall-, Kitasato-, Ton-Filter) ihre Zusammensetzung ändern. Ebenso hat sich für viele Kolloidlösungen zeigen lassen, daß ein durch sie hindurchgesandter Lichtstrahl reflektiert und polarisiert wird (Tyndall-Versuch).

Gegen die Beweiskraft beider Tatsachen sind Einwände erhoben worden, namentlich gegen den Tyndall-Versuch, um so erwünschter ist es, daß Siedentopf und Zsigmondy neuerdings die ultramikroskopischen Teilchen und damit die Suspension noch mit Hilfe einer besonderen Methode haben sichtbar machen können.

Neben diesen Beweisen für den Suspensionscharakter der kolloidalen Lösungen dürfen aber die Tatsachen nicht außer acht gelassen werden, die zeigen, daß in ihnen zum Teil auch echte Lösungen vorliegen. Man muß eben bedenken, daß der qualitative Nachweis, daß suspendierte Körperchen in Kolloidlösungen vorhanden sind, noch nicht zeigt, daß quantitativ der ganze Gehalt der Lösung suspendiert ist. So ergaben mir Versuche, daß Lösungen von kristallisiertem Serumalbumin und ebenso von Eieralbumin durch alle Filter durchgehen. Aber selbst von reinem Leim passierten mir verdünnte Lösungen (1:1000) ein Chamberlandfilter, das gleiche konnte für Lösungen eines sorgfältig von mir gereinigten Kaseins gezeigt werden. — Ebenso gibt es Arsentrisulfid- und Kieselsäurehydrosole, die durch Tonfilter hindurchgehen; man kann also die Filtrierbarkeit den kolloidalen Lösungen nicht absolut absprechen.

*) Auch zur Herstellung der Metallsole nach Bredig bedarf es der Zufügung geringer Mengen Alkali.

Am meisten diskutiert worden ist in den letzten Jahren die Frage, ob Kolloidlösungen einen osmotischen Druck auszuüben imstande sind.

Eine Reihe von Forschern gibt auf Grund von Versuchen mit den neuen Molekulargewichtsbestimmungsmethoden an, daß den Kolloidlösungen ein osmotischer Druck zukäme.

Gegen alle diese Versuche läßt sich freilich einwenden, daß die gefundenen Werte gering und vielleicht durch anhaftende, schwer zu entfernende anorganische Beimengungen bedingt sind. Ein solcher Einwand läßt sich aber nicht erheben gegenüber jenen Versuchen, wo der osmotische Druck direkt, d. h. durch Anwendung halbdurchlässiger Membranen geprüft wurde. Da diese Membranen für Salze durchgängig sind, muß, wenn die Versuche sorgfältig gemacht, d. h. bis zur Konstanz der gefundenen Zahlen durchgeführt sind, der beobachtete Wert auf die gelöste, nicht durchgehende kolloidale Substanz bezogen werden. So berechnet sich z. B. aus einem Versuch von W. Pfeffer mit Gelatine und einer Ferrocyankupfermembran für Leim ein Molekulargewicht von 4153. Auch ich konnte, als ich auf Veranlassung von Prof. Hofmeister Schilfschläuche als Dialysiermembran anwandte, beobachten, daß Serum, auch wenn es immer wieder dialysiert war, deutlichen osmotischen Druck (Ansteigen in einer Kapillare) zeigte (Starling).

Gegen die Beweiskraft der Versuche Pfeffers und seiner Nachfolger hat G. Bredig, „um der immerhin etwas gezwungenen Annahme von Molekulargewichten von der Größe 1000 bis 50000“ zu entgehen, geltend gemacht, daß der nachgewiesene osmotische Druck durch die Potentialdifferenz erklärt werden kann, die Suspensionen gegen das umgebende Medium zeigen („pseudoosmotischer Druck“). Nun haben aber, um nur ein Beispiel anzuführen, verschiedene analytische Methoden übereinstimmend gezeigt, daß dem reinen, gut kristallisierenden Oxyhämoglobin ein Molekulargewicht von etwa 15000 zukommt. Die gefundenen Zahlen für den osmotischen Druck stimmen also der Größenordnung nach mit den Befunden überein, die auf ganz anderem Wege gewonnen sind, die kolloidalen Lösungen scheinen also osmotisch wirksam zu sein.

Für die Fähigkeit der Kolloide, echte Lösungen zu bilden, sprechen weiter auch die Erfahrungen von G. Wiedemann und Lüdeking, die bei ihren (allerdings nicht salzfreien?) Kolloiden neben der mit Wärmeentwicklung einhergehenden Hydratation auch einen mit Wärmebindung verknüpften Lösungsvorgang nachweisen konnten.

Eigentlich ist die Kristallisierbarkeit einzelner Kolloide eo ipso ein Beweis für ihre Fähigkeit, echte Lösungen zu bilden, denn nur in echter Lösung ist jene unendlich feine Verteilung der gelösten Teilchen gegeben, die eine Anlagerung derselben nach bestimmten Raumrichtungen, ein Wachsen unter Bildung von scharf begrenzten Formen verständlich erscheinen läßt. Suspensionen können nur Agglomerate, aber keine Kristalle liefern.

Sicher nachgewiesen ist auch die Fähigkeit der Kolloide, zu diffundieren; das hat schon Graham in seiner grundlegenden Arbeit gezeigt, später aber hat man, um die von Graham vorgenommene Scheidung zwischen Kolloiden und Kristalloiden noch konsequenter, als dies ihr Autor getan hat, durchzuführen, die allerdings geringe Diffusion auf die vermeintliche Gegenwart von Poren in den meist angewandten tierischen Membranen zurückgeführt. — Einen solchen Verdacht kann man nicht mehr äußern, wenn man z. B. dicke Leimscheiben als Diffusionsmembran benutzt. So gelang mir der Nachweis leicht, daß z. B. eine Lösung von kristallisiertem Eieralbumin durch reine Gelatine hindurchdiffundiert, da diese beiden Eiweißkörper durch Koagulierung und Aussalzung leicht zu unterscheiden sind. Ebenso diffundierte eine Hämoglobinlösung in eine Leimplatte hinein, wie ich mich durch die beim Liegenlassen in einer Hämoglobinlösung auftretende diffuse Färbung der Leimplatte und die spektroskopische Untersuchung überzeugen konnte.

Natürlich soll damit nicht gesagt sein, daß jedes Kolloid für jedes andere durchlässig ist; Leim nimmt z. B. weder kolloidales Eisenoxyd noch Arsentrisulfid auf (während andererseits das Schulzesche Arsentrisulfid nach Linder und Picton durch Membranen diffundiert, obgleich es keine Gefrierpunktsdepression erkennen läßt). Hier finden sich vielmehr dieselben Differenzen der Löslichkeit wieder wie bei den echten Kristalloiden. Auch die Diffusionsfähigkeit ist keine absolute Eigenschaft, die der einen Körperklasse zukommt, der anderen fehlt, sie kann beiden zukommen, nur wechselt sie außerordentlich je nach der Natur der angewandten Membran. Wollte man die Trennung von Kolloid und Kristalloid nach osmotischen Verhältnissen vornehmen, so würde sie total verschieden ausfallen, je nachdem man eine Membran aus Pergamentpapier oder Kollodium oder Platin zugrunde legte.

Von den Eigenschaften, die sonst noch als charakteristisch für Kolloide angesehen werden, ihrer Fällbarkeit und ihrer

Fähigkeit, in eine unlösliche Modifikation überzugehen, ist in der vorigen Abhandlung gezeigt worden, daß sie zur Scheidung der beiden Körperklassen nicht ausreichen, und da auch die anderen für Kolloide charakteristischen Eigenschaften, ihre Unfähigkeit, klare Lösungen zu geben, ihre Ausfrierbarkeit, ihre Nichtkristallisierbarkeit*), nicht immer vorhanden sind und nicht allen Kolloiden zukommen, so müssen wir sagen, daß es kein Einteilungsprinzip gibt, das eine scharfe Trennung zwischen Kolloiden und Kristalloiden im gegenwärtigen Sinne gestattet.

Will man ein Nebeneinander „zweier scharf getrennter Welten von Materie“ im Sinne von Graham festhalten, so bleibt, wenn man folgerichtig vorgehen will, nichts übrig, als die Grenze des Kolloidbegriffs enger zu stecken, d. h. ihn auf jene unlöslichen, aber quellbaren Stoffe zu beschränken, die keine echten Lösungen zu bilden vermögen. „Kolloidale Lösung“ wäre dann aber eine contradictio in adjecto. Wir finden kolloidale Eigenschaften nur bei einem zweiphasigen System, können aber die Eigenschaften bloß der einen Phase nicht zum Prinzip der Klassifikation machen.

Ovalbumin, Serumalbumin und Hämoglobin wären dann trotz ihrer Eiweißnatur keine Kolloide mehr, sondern wahre Kristalloide, die nur wegen einzelner, aus ihrem hohen Molekulargewicht sich ergebender Eigenschaften und wegen ihrer Überführbarkeit in echte Kolloide der Klassifikation Schwierigkeiten bereiten.

Ein solches Zurückgreifen auf den Ausgangspunkt der Kolloidfrage würde sowohl dem Gedankengang Grahams als auch dem von ihm gewählten Namen gerecht werden.

Literaturverzeichnis.

van Bemmelen, Die Adsorption. Das Wasser in den Kolloiden Zeitschr. f. anorg. Chemie **13**, 233; **18**, 14 bis 37.

Bredig, G., Anorgan. Fermente. Leipzig 1901.

Bütschli, Über den Bau quellbarer Körper. Abh. d. Kais. Ges. d. Wiss. zu Göttingen 1895.

Graham, Anwendung der Diffusion der Flüssigkeiten zur Analyse. Annalen der Chemie **121**.

Hantzsch, Über farbige organische Ferri-Verbindungen (mit C. H. Desch). Annalen der Chemie **323**, 1 bis 31.

Hofmeister, Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **27**, 395; **28**, 210.

*) Daß amorph nicht gleich „kolloid“ zu setzen ist, wie einzelne Forscher auch in neuester Zeit gewollt haben, zeigen die kristallisierbaren Albumine. Dieser „Erklärungs“-Versuch führt nur wiederum vor Augen, wie schwer oder unmöglich vom bisherigen Standpunkt eine präzise Trennung ist.

Hofmeister, Über die Darstellung kristallinischen Eieralbumins und über die Kristallisierbarkeit kolloider Stoffe. Zeitschr. f. physiol. Chemie **14**, 145.

Derselbe, Über Bau und Gruppierung der Eiweißkörper. Ergebnisse der Physiologie **1**, 759.

Jordis, Ed., und E. H. Kanter, Beiträge zur Kenntnis der Kieselsäure. Zeitschr. f. anorg. Chemie **34**, 455; **35**, 16 bis 22.

Lottermoser, Alf., Über anorganische Kolloide. Stuttgart 1901.

Lüdeking, Ch., Über das physikalische Verhalten von Lösungen der Kolloide. Wiedemanns Annalen **35**, 552.

Müller, Arth., Die Theorie der Kolloide. Leipzig 1903.

Oker-Blom, M., Über einige Gleichgewichtsbedingungen im Organismus. Die osmotischen Eigenschaften der Serumeiweißkörper. Skand. Arch. f. Phys. **15**, 114.

Pauli, W., Untersuchungen über den Quellungsvorgang. Pflügers Archiv **67**, 219; **71**, 1.

Pfeffer, W., Osmotische Untersuchungen. Leipzig 1877.

Quincke, Wiedemanns Annalen **35**, 561; Drudes Annalen **7** bis **10**.

Rodewald, H., Untersuchungen über die Quellung der Stärke. Kiel-Leipzig, Lipsius-Tischer. 1896.

Spiro, Über physikalische und physiologische Selektion. Straßburg i. E., Schmidt. 1897. — Die Fällung von Kolloiden. Diese Beiträge **4**, 300.

Starling, E. H., Journal of Physiology **24**, 257, 1899.

Wiedemann, E., und Lüdeking, Über die Wärmeentwickelung bei der Quellung und Lösung der Kolloide. Wiedemanns Annalen **25**, 145.

Zsigmondy, R., Über kolloidale Lösungen. Zeitschr. f. Elektrochemie 1902, Nr. 36.

Derselbe und Siedentopf. Drudes Annalen 1903.

XVII.

Über die Verteilung des Stickstoffs im Eiweißmolekül.

Von Dr. **Theodor Gümbel.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Unter diesem Namen hat W. Hausmann*) vor nahezu fünf Jahren nach dem Vorgange E. Schulzes ein Verfahren ausgearbeitet, das es ermöglichen sollte, auf wenig umständliche Art und mit einer geringen Menge Ausgangsmaterial einen Überblick über die Bindung des Stickstoffs im Eiweiß zu gewinnen.

Das von ihm geübte Verfahren setzt sich aus nachstehenden Operationen zusammen:

1. Spaltung von etwa 1 g des Eiweißkörpers mit siedender konzentrierter Salzsäure.
2. Bestimmung des dabei in Ammoniumsalz übergeführten Stickstoffs durch Abdestillieren mit Magnesia (Amidstickstoff, Ammoniakstickstoff, leicht abspaltbarer Stickstoff).
3. Fällung der ammoniakfrei gemachten Flüssigkeit mit Phosphorwolframsäure und Bestimmung des in den Niederschlag eingegangenen Stickstoffs (Diaminostickstoff, basischer Stickstoff).
4. Bestimmung des durch Magnesia nicht austreibbaren und durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stickstoffs (Monaminostickstoff).

Hausmann hat nicht ermangelt, auf eine Anzahl von Fehlerquellen und Schwierigkeiten des Verfahrens hinzuweisen und kommt in betreff der Zuverlässigkeit der damit erzielbaren Resultate zu dem Schlusse, daß es die Bestimmung des Amidstickstoffs mit großer Schärfe durchzuführen gestattet, daß aber im übrigen die Werte nicht als absolut genau anzusehen sind, wenngleich sie eine Verwertung für die Unterscheidung und Charakterisierung der einzelnen Eiweißkörper sowie für die Beurteilung ihrer Beziehungen zueinander gestatten.

---

*) Zeitschr. f. phys. Chemie 27, 91; 29, 136.

Hausmann war es seinerzeit nicht gelungen, für den Basenstickstoff des Serumalbumins übereinstimmende Zahlen zu erhalten, weshalb Herr Prof. Hofmeister mich veranlaßte, die Untersuchung dieses Eiweißkörpers zu wiederholen, die Ursache dieses Mißerfolges aufzuklären und das Verfahren auf andere Proteide auszudehnen. Diese Untersuchungen waren nahezu abgeschlossen, als eine Arbeit von Kutscher*) erschien, die auf Grund von vier mit Kasein ausgeführten Versuchen nach Hausmann zu dem Schlusse kommt, daß Hausmanns Verfahren „keine zuverlässigen Werte liefern kann". Sie gab mir Veranlassung, Hausmanns Verfahren neuerlich einer Nachprüfung zu unterziehen, zumal auch von anderer Seite wenig günstige Urteile über die Brauchbarkeit des Verfahrens laut geworden waren. Infolge äußerer Umstände verzögerte sich die Publikation meiner einschlägigen Erfahrungen; nur wurde ein Teil der von mir gefundenen Zahlen von Hofmeister**) in seiner zusammenfassenden Darstellung „über Bau und Gruppierung der Eiweißkörper" vorläufig mitgeteilt. Die Verzögerung hat die günstige Folge gehabt, daß ich mich nunmehr auch auf die inzwischen erschienene gründliche Untersuchung von Osborne und Harris***) über den Stickstoff der Eiweißkörper beziehen kann, in der das Verfahren von Hausmann in betreff seiner Vorzüge und Schwächen sachlich beurteilt und ganz im Gegensatz zu Kutscher als für den von Hausmann ins Auge gefaßten Zweck geeignet hingestellt wird.

Da das Ergebnis meiner Untersuchungen über das Hausmannsche Verfahren in der Hauptsache mit jenem von Osborne und Harris übereinstimmt, so kann ich mich in vieler Beziehung kürzer fassen, als es sonst möglich gewesen wäre. Doch sind meine Erfahrungen namentlich in methodologischer Richtung geeignet, die Angaben der amerikanischen Forscher in mancher Beziehung zu vervollständigen. Auch liegt jetzt soviel tatsächliches Material vor, daß es möglich ist, die Bedenken, die gegen das Verfahren geltend gemacht werden können, in zusammenfassender Weise zu beleuchten.

I. Die Bestimmung des Amidstickstoffs.

Y. Henderson†) hat zuerst gegen diesen Teil des Verfahrens den Einwand erhoben, daß die Konzentration der zur Spaltung

*) Zeitschr. f. phys. Chemie 31, 215.

**) Ergebn. d. Physiologie, her. von Asher u. Spiro. Biochemie 1, 772.

***) Journ. of the Americ. Chem. Soc. 25, Nr. 4.

†) Zeitschr. f. phys. Chemie 29, 50.

verwendeten Säure sowie die Dauer ihrer Einwirkung auf die erhaltenen Zahlen von Einfluß sei.

Die von Henderson in einer Tabelle mitgeteilten Zahlen rechtfertigen diesen Schluß nur zum Teil, da sich in ihnen ein solcher Einfluß weder konstant noch in für den Zweck der Untersuchung erheblichen Differenzen äußert.

Berechnet man seine Zahlen, die nach Hausmanns Vorbild in Prozenten des Gesamtstickstoffs (dieser = 100) ausgedrückt sind, auf die üblichen Stickstoffwerte, so bleiben die Differenzen zum Teil ganz innerhalb der Fehlergrenzen. So gibt Edestin, um nur ein Beispiel anzuführen, beim Kochen mit konzentrierter Salzsäure nach 7, bzw. 20 bis 40 Stunden 9,7, bzw. 10,2 bis 11,2 Proz. Amidstickstoff ab. Legt man den Stickstoffgehalt des Edestins zu 18,64 Proz. zugrunde, so stellen sich die obigen Werte zu 1,81, bzw. 1,90 und 2,09 Proz. des Trockengewichts heraus. Das gibt eine Differenz von 0,14 Proz. In anderen Versuchen, so bei denen, wo Kasein mit Schwefelsäure von wechselnder Konzentration verschieden lang erhitzt wurde, schwanken die erhaltenen Zahlen ganz unregelmäßig um einen Mittelwert.

Derzeit liegen von ganz verschiedenen Seiten Angaben vor, die einen ganz objektiven Vergleich ermöglichen. Ich will hier die für Edestin und Kasein erhaltenen Daten nebeneinander setzen.

Tabelle I.

Autor	Eiweißkörper	Verwendete Säure	Kochdauer in Stunden	Stickstoff in Prozent	Mittel Proz.
Hausmann	Edestin aus Hanfsamen	konz. Salzsäure	5	1,87	1,87
"	"	"	"	1,95	
Gümbel*)	"	"	"	1,79	
Henderson	"	"	7	1,81	1,88
"	"	"	7	1,81	
"	"	"	20	1,90	
"	"	"	40	2,09	
"	"	5 proz. Schwefels.	5	1,81	
"	"	10 " "	10	1,72	
"	"	10 " "	40	2,06	
"	"	15 " "	15	1,84	
"	"	20 " "	20	1,84	
"	"	40 " "	20	1,96	
Osborne und Harris	"	20 proz. Salzsäure	7—10	1,86	1,88
"	"	" "	"	1,86	
"	"	" "	"	1,93	

*) Über die von Hausmann gefundenen Kaseinwerte s. u. Die obigen Werte sind sämtlich, um sie vergleichbar zu machen, auf einen Stickstoffgehalt von 18,64 Proz. beim Edestin, von 15,62 Proz. beim Kasein berechnet.

Autor	Eiweißkörper	Verwendete Säure	Kochdauer in Stunden	Stickstoff in Prozent	Mittel Proz.
Henderson	Kasein	konz. Salzsäure	7	1,59	1,63
"	"	"	20	1,66	
Gümbel	"	"	5	1,60	1,60
Kutscher	"	Salzsäure v. 1,19 D	6	1,63	1,60
"	"	"	6	1,61	
"	"	"	6	1,58	
"	"	"	6	1,57	
Osborne und Harris	"	20 proz. Salzsäure	7—10	1,65	1,61
"	"	" "	7—10	1,58	
Henderson	"	5 proz. Schwefels.	5	1,53	1,60
"	"	10 " "	10	1,59	
"	"	15 " "	15	1,70	
"	"	20 " "	20	1,55	
"	"	40 " "	20	1,63	

Die außerordentlich gute Übereinstimmung der von verschiedenen Autoren bei wechselndem Säuregehalt und verschiedener Kochdauer erhaltenen Werte lassen Hendersons Bedenken in ihrer allgemeinen Fassung als völlig hinfällig erscheinen. Die Werte für den Amidstickstoff gehören zu den schärfst bestimmbaren unter den konstitutionellen Merkmalen der Proteinstoffe. Sollte sich bei einem Proteinstoffe in dieser Beziehung eine Inkonstanz zeigen, so dürfte man das als einen Hinweis auf einen eigenartigen Bau gerade dieses Stoffes ansehen. Daß schwerer angreifbare Eiweißkörper bei niedriger Säurekonzentration und kurzer Dauer der Einwirkung nicht ihren ganzen Amidstickstoff abgeben, ist selbstverständlich. Daß umgekehrt bei sehr lang dauernder Einwirkung von konzentrierter Säure, namentlich der Schwefelsäure, sekundäre Reaktionen an den gebildeten Spaltungsprodukten eintreten können, die zu einer abweichenden Amidzahl führen, kann nicht befremden. Da aber solche sekundäre Reaktionen, falls überhaupt, nur bei außerordentlich verlängerter Säurewirkung eintreten, ist es nicht schwierig, sie zu vermeiden.

Für die Ermittelung dieser Konstante bei einem noch nicht untersuchten Eiweißkörper empfiehlt es sich, den Zeitpunkt der völligen Aufspaltung zu ermitteln. Man kann dann so verfahren wie Hausmann, der zu seiner Vorschrift auf Grund der Erfahrung gelangte, daß bei stundenlang über die angegebene Zeit fort-

gesetztem Kochen eine merkliche Änderung der erhaltenen Amidwerte nicht eintritt, oder wie Osborne und Harris, die sich von dem Verschwinden der Biuretreaktion leiten ließen.

Ich habe mit Rücksicht auf Hendersons Angaben mit Hornspänen und Knorpel Versuche angestellt, bei denen die Kochdauer von 5 Stunden bis 24 Stunden wechselte. Zuerst erhielt ich in der Tat Resultate, die ein geringes Ansteigen bei sehr lang dauernder Säurewirkung zu ergeben schienen. Als Quelle dieser Zunahme ergab sich jedoch bald die Verwendung von Korkverbindungen am Steigrohr. Sie blieb aus, als ich Steigrohre mit Glasschliff in Verwendung zog.

Ein anderes Moment, das bei der Bestimmung der Amidzahlen Beachtung verdient, ist die Verwendung von Magnesia zur Austreibung des Ammoniaks. Osborne und Harris bemerken, der Beweis sei eigentlich nicht erbracht, daß das gefundene Ammoniak bloß aus den durch die Säurewirkung gebildeten Ammoniumsalzen stamme.

In dieser Richtung hat Herr Dr. Embden hier bisher nicht veröffentlichte Vergleichsversuche angestellt, die durch die Beobachtung veranlaßt waren, daß das als Spaltungsprodukt der Eiweißkörper auftretende Cystin beim anhaltenden Kochen mit Magnesia erhebliche Mengen Ammoniak abgibt. Um diese Fehlerquelle auszuschalten, hat Herr Dr. Embden, wie er mir mitzuteilen gestattet, zuerst die Amidbestimmung so ausgeführt, daß die Magnesiadestillation im Vakuum bei einer 40 bis 42° nicht übersteigenden Temperatur vorgenommen wurde, bei welcher Versuchsanordnung Cystin keine Spur von seinem Ammoniak abgibt. Die so erhaltenen Werte bleiben meist gegen die durch stärkeres Erhitzen gefundenen etwas zurück. So fand Embden bei kristallisiertem Ovalbumin den Amidstickstoff = 1,15 Proz. (gegen 1,2 bis 1,3 Proz.), ich selbst bei Edestin 1,79 Proz. (gegen 1,90 Proz.).

Auch ergab sich keine Tatsache, die darauf hingedeutet hätte, daß bei der Säurespaltung eine andere Substanz entsteht, die beim Kochen mit Magnesia Ammoniak abgibt. Nach dem eben erwähnten Verhalten des Ovalbumins scheint auch ein hoher Gehalt an Glykosamin in dieser Richtung keine Fehlerquelle zu bilden.

Immerhin wird es sich künftig empfehlen, die Bestimmung des Amidstickstoffs durch Destillation im Vakuum bei 40° vorzunehmen, bei welcher Temperatur, wie Schwarzschild*) sichergestellt hat, auch so zersetzliche Säureamide wie Asparagin un-

*) Diese Beiträge 4, 155.

verändert bleiben. Ganz besonders wird sich dies für die Untersuchung der an Cystin so reichen Hornsubstanzen empfehlen.

Auf eine weitere Fehlerquelle, die die Amidzahl beeinflussen kann, die Bildung von Melaninen auf Kosten abgespaltenen Ammoniaks, komme ich noch zu sprechen. Eine praktische Bedeutung scheint ihr nicht zuzukommen.

II. Die Bestimmung des Diaminostickstoffs.

Gewichtigere Einwände lassen sich gegen die Bestimmung des Diaminostickstoffs erheben. Sie betreffen folgende Punkte:

a) Die Phosphorwolframate der Diaminosäuren sind nicht absolut unlöslich — die nach Hausmann erhaltenen Werte für Diaminostickstoff müssen somit zu niedrig ausfallen.

b) Auch die Monaminosäuren bilden unter bestimmten Bedingungen Phosphorwolframate. Bei Ausfällung der Diaminosäuren aus konzentrierter Lösung läuft man Gefahr, den Stickstoff der Monaminosäuren mit zu bestimmen.

c) Der Stickstoff der bei Säurewirkung entstehenden Melanine (Huminkörper) wird bei der ursprünglichen Hausmannschen Vorschrift mit dem Diaminostickstoff zusammen bestimmt und erhöht daher diesen Wert.

a) Was zunächst die besonders von Kutscher betonte Löslichkeit der Phosphorwolframate betrifft, so ist seinerzeit die Löslichkeit des Argininphosphorwolframats von Gulewitsch*) genau bestimmt worden. Danach bleiben bei Fällung von Arginin mit Phosphorwolframsäure aus wässeriger schwefelsaurer Lösung bei einem genügenden Überschuß des Reagens etwa 0,07 g Arginin in 1 Liter Flüssigkeit (1 Teil in 14000 Teilen Lösung) gelöst. Bei ungenügendem Zusatz des Reagens kann der Verlust bis 0,2 g Arginin pro Liter (1 : 5000) betragen.

Über die Löslichkeit der Phosphorwolframate des Lysins und Histidins liegen mir Bestimmungen nicht vor.

Zur Beurteilung dieses Einwurfs war es nötig, die Löslichkeitsverhältnisse der Phosphorwolframate unter den bei Hausmanns Verfahren gegebenen Bedingungen festzustellen. Ich habe mich dabei zunächst an das Arginin gehalten, da dieses seiner Menge nach in der Regel unter den Diaminosäuren überwiegt. Das verwandte Argininchlorhydrat wurde mir von Herrn Professor Hofmeister aus der Sammlung des Institutes zur Verfügung gestellt, Lysinchlorhydrat und Histidinchlorhydrat verdanke ich dem freundlichen Entgegenkommen der Herren Professor

*) Zeitschr. f. phys. Chemie 27, 195.

Winterstein in Zürich und Dr. S. **Fränkel** aus Wien, denen ich meinen verbindlichsten Dank ausspreche.

Bei Aufspaltung von 1 g Eiweiß entstehen, soweit es sich um tierische Eiweißstoffe handelt, wie sich auf Grund der vorliegenden Versuche ergibt, meist mehr denn 0,1 g Diaminosäuren, d. h. über 3 Proz. Diaminostickstoff. Wird die Zersetzungsflüssigkeit nach Abdestillieren des Ammoniaks mit Magnesia, wie das Hausmann ähnlich getan hat, auf 70 bis 80 ccm Flüssigkeit gebracht und mit Phosphorwolframsäure gefällt, so erfolgt die Abscheidung bei einer Konzentration von etwa 1 : 700 bis 800, bzw. bei einer noch höheren Konzentration aus einer sauren und einige Prozent (etwa 4 Proz.) Magnesiumchlorid enthaltenden Flüssigkeit.

Ich habe daher eine Lösung von 1 Teil Argininchlorhydrat in 700 Teilen Wasser, entsprechend 0,118 Proz. Arginin, hergestellt, von dieser Lösung je 1 ccm mit wechselnden Mengen Phosphorwolframsäure versetzt und die Löslichkeit des entstandenen Niederschlags in Wasser und in saurer Phosphorwolframsäurelösung untersucht, die derart hergestellt war, daß ich je ein Volumen einer konzentrierten Lösung von kristallinischer Phosphorwolframsäure und etwa 10 proz. Salzsäure zusammenbrachte, das Gemenge so lange stehen ließ, bis sich keine Phosphorwolframsäurekristalle mehr abschieden und dann auf das 10fache verdünnte. Überdies wurde die Löslichkeit in der gleichen Säuremischung bei Anwesenheit von Magnesiumchlorid untersucht, indem ich auf je 1 ccm Argininlösung 1 ccm Magnesiumchloridlösung zusetzte.

Das Ergebnis ist aus nachstehender Tabelle ersichtlich.

Tabelle II.

Arginin-chlor-hydrat-lösung ccm	Arginin in g	Überschuß an gesättigter Phosphor-wolframsäure-lösung Tropfen *)	Der Niederschlag löst sich in ccm: Wasser	Zehnfach verdünnter Phosphorwolframsalzsäure: sofort nach dem Ausfällen	Zehnfach verdünnter Phosphorwolframsalzsäure: nach 24 Stunden	Zehnfach verdünnter Säuremischung + 1 ccm 4 proz. Magnesiumchloridlösung
1	0,00118	0	8,0	11,0	14.4	12,5
1	„	1	10,4	12,5		14,5
1	„	2	13,1	13,5		17,5
1	„	3	13,6	14,5		18,0
1	„	4		16,5	18,5	19,0
1	„	5	17,7	19,0	21,0	21,0
1	„	6	20,0	21,0	23,0	23,0
1	„	7	17,7	23,5	25,5	25,5
1	„	8	17,6	25,1	25,1	25,0
1	„	9	17,7	28,0	25,5	21,0

Wie man sieht, löst sich der Niederschlag am leichtesten in Wasser, schwerer in einer Mischung von verdünnter Salzsäure und Phosphorwolframsäure, noch schwerer in dieser Mischung, wenn man den Niederschlag 24 Stunden stehen läßt oder ein

*) 1 Tropfen = 0,05 ccm.

Neutralsalz (Natriumchlorid oder Magnesiumchlorid) zusetzt. Daß der Niederschlag nach 24stündigem Stehen sich schwerer löst als unmittelbar nach dem Ausfällen, ist darauf zurückzuführen, daß der Niederschlag zunächst amorph ist und erst nach Verlauf einiger (4 bis 6) Stunden kristallinisch zu werden anfängt.

Da bei Hausmanns Verfahren die Ausfällung mit einem Überschuß von Phosphorwolframsäure erfolgt, so sind die Bedingungen der Abscheidung die relativ günstigsten.

Die Lösung des Phosphorwolframsäureniederschlags von 0,00118 Arginin (= 0,00038 g Stickstoff) erfolgt auf Zusatz der Phosphorwolframsäureflüssigkeit erst bei einem Gesamtvolumen von 26 bis 30 ccm, d. h. bei einer Verdünnung von 1:22000 bis 1:25000. Die Löslichkeit des Argininphosphorwolframats ist unter diesen Bedingungen viel kleiner als in reinem Wasser und jedenfalls ausreichend, um als Grundlage für eine Bestimmung dienen zu können. Bei einem Volumen von 80 ccm sollten danach etwa 0,0035 g Arginin (= 0,001 g Stickstoff) ungefällt bleiben, was bei einem Arginingehalt des Eiweißmoleküls von 10 bis 20 Proz. einen Verlust von etwa 1,8 bis 3,5 Proz. bedeutet.

Vergrößert wird dieser Verlust durch das Auswaschen des Niederschlags, auch wenn als Waschflüssigkeit eine verdünnte saure Phosphorwolframsäurelösung von obiger Zusammensetzung benutzt wird.

Etwas über 0,1 g Argininchlorhydrat, entsprechend dem Gehalt von 1 g eines an Diaminosäuren relativ armen Eiweißkörpers wurde im Verhältnis 1:700 gelöst, mit Phosphorwolframsäure gefällt, die Fällung 24 Stunden stehen gelassen und dann mit dem 10fachen Volumen verdünnter Säuremischung, der noch 4 Proz. Magnesiumchlorid zugesetzt waren, ausgewaschen.

0,1120 g	Argininchlorhydrat mit	0,0298 g N	gaben 0,0259 g N	= 86,9 Proz.
0,1194 „	„ „	0,0318 „ „	„ 0,0282 „ „	= 88,7 „
0,1290 „	„ „	0,0343 „ „	„ 0,0308 „ „	= 89,7 „
0,1254 „	„ „	0,0334 „ „	„ 0,0304 „ „	= 91,0 „

Bei so anhaltendem Auswaschen ergibt sich somit bei einem Ausgangsgewicht von etwa 0,1 g Arginin ein Verlust von rund 10 Proz. des gesamten Diaminostickstoffs. Dieser Wert ist aber als ein oberer Grenzwert anzusehen, da es zum Auswaschen gar nicht so großer Flüssigkeitsmengen bedarf, zumal wenn es an der Saugpumpe vorgenommen wird. Die Größe dieses Verlustes wird bei argininreichen Eiweißkörpern weniger ins Gewicht fallen als bei argininarmen, wenngleich im letzteren Falle, wo das Volumen des Niederschlages ein viel geringeres ist, das Auswaschen viel rascher beendet ist.

Lysin, bzw. Lysinphosphorwolframat bietet, soweit ich nach einigen Versuchen beurteilen kann, ganz ähnliche Verhältnisse wie



das Arginin. Es wird wie Arginin von Phosphorwolframsäure noch in sehr starken Verdünnungen (über 1:6000) gefällt; auch einem Überschusse von Phosphorwolframsäure gegenüber verhält es sich ähnlich.

Ganz anders das Histidin. Es ist wohl durch Phosphorwolframsäure gut fällbar, aber beim geringsten Überschusse von konzentrierter Säure geht der Niederschlag in Lösung. Wird nun diese Lösung durch Zusatz von verdünnter Phosphorwolfram-Salzsäure verdünnt, so fällt das Histidinphosphorwolframat wieder aus, und dieser Niederschlag ist bei neuerlichem Zusatze von verdünnter Säure viel weniger löslich als die entsprechenden Fällungen des Arginins und Lysins.

Aus diesem Verhalten ergibt sich für die Ausführung der Bestimmung die Regel, einen Überschuß von Phosphorwolframsäure anzuwenden, aber nicht in zu hoher Konzentration, da sonst Histidin in Lösung ginge. Beides wird erreicht, wenn man die Verdünnung der Zersetzungsflüssigkeit so wählt, daß auf 1 Teil Diaminostickstoff 1000 bis 1500 ccm Lösung kommen. Ist die Histidinausfällung unvollständig geblieben, so findet im Filtrate bei Verdünnen oder bei Zusatz von verdünnter Phosphorwolframsäuremischung neuerliche Ausscheidung statt.

Da die erste flockige Fällung viel löslicher ist als der kristallinische Niederschlag, so ist mit Abfiltrieren und Waschen zu warten, bis der Niederschlag kristallinisch geworden ist. Meist ist diese Umwandlung nach 24, oft schon nach weniger Stunden vollendet, mitunter dauert es auch länger. Es ist deshalb weniger Gewicht auf 24 stündiges Stehenlassen des Niederschlages zu legen, als darauf, daß derselbe beim Umrühren rein körnig, frei von jeder flockigen Beimengung erscheint. Ich habe bei meinen Bestimmungen die Filtrate und Waschwässer wochenlang stehen lassen, ohne daß sich nachträglich auch nur eine Spur des charakteristischen weißen Niederschlags gebildet hätte. Beim Auswaschen muß man sich, um Verluste zu vermeiden, auf die Verwendung möglichst geringer Mengen von Waschflüssigkeit beschränken.

Bei Einhaltung dieser Bedingungen kann der Bestimmungsfehler auf 5 bis 10 Proz. des gesamten Diaminostickstoffs veranschlagt werden, d. h. man findet z. B. statt 4 Proz. Diaminostickstoff nur 3,6 bis 3,8 Proz. Wie erwähnt, sind die Verluste bei höherem Gehalt an Diaminosäuren kleiner.

b) Nach Kutscher soll die Fällbarkeit von Monaminosäuren durch Phosphorwolframsäure eine wichtige Fehlerquelle darstellen. Daß Monaminosäuren in sehr konzentrierter Lösung namentlich bei sehr hohem Säurezusatz [z. B. Zusatz von Kjeldahlsäure*)] mit Phosphorwolframsäure ausfallen, ist bekannt, ebenso steht aber

*) Vgl. Stolte, Diese Beiträge 5, 19.

fest, daß das bei stärker verdünnten Lösungen und mäßigem Säurezusatz nicht der Fall ist.

Da die sämtlichen Spaltungsprodukte von 1 g Eiweiß bei der mitgeteilten Art der Ausführung vor dem Phosphorwolframsäurezusatz in etwa 70 bis 80 ccm Flüssigkeit enthalten sind, so kann sicher keines der zahlreichen gebildeten Produkte in einer höheren denn etwa 0,5proz. Konzentration vorhanden sein, und es fragt sich demgemäß, ob eine der gebildeten Monaminosäuren bei solcher Verdünnung mit Phosphorwolframsäure fällt. Diese Frage war für die zur Zeit, da Hausmann arbeitete, als Spaltungsprodukte bekannten Aminosäuren durch seine und neuere Versuche negativ entschieden und Kontrollversuche Hausmanns sowie Erfahrungen von Schulze und Winterstein haben seitdem neuerlich dasselbe ergeben.

Hingegen konnte an eine Fällbarkeit des Phenylalanins und Cystins gedacht werden, zumal da Schulze und Winterstein*) die Abscheidung dieser Aminosäuren durch Phosphorwolframsäure empfohlen haben.

Da nach Winterstein 0,1 g Phenylalanin, wenn in 50 ccm Wasser gelöst, nicht mehr von Phosphorwolframsäure gefällt wird, die in 1 g Proteinstoff enthaltene Menge dieser Aminosäure sicher aber nicht 0,2 g erreicht, so ist diese Fehlerquelle ausgeschlossen. Bezüglich des Cystins ist von Mörner**) angegeben, daß es durch Phosphorwolframsäure in salzsaurer Lösung nicht gefällt wird. Winterstein findet es in verdünnter schwefelsaurer Lösung fällbar. Nach Versuchen im hiesigen Laboratorium wird eine 0,05proz. salzsaure Lösung von reinem Eiweißcystin von Phosphorwolframsäure, falls ein großer Überschuß vermieden wird, auch bei 24stündigem Stehen nicht mehr gefällt. Bei der sehr geringen Menge, in der Cystin aus den meisten Eiweißstoffen entsteht, ist somit ein Irrtum von dieser Seite nicht zu befürchten. In der Zersetzungsflüssigkeit sind vermutlich die Ausscheidungsbedingungen noch ungünstiger***).

c) Bei der Spaltung von Proteinstoffen mit Säure entstehen Melanine (Huminkörper), deren Stickstoffgehalt Hausmann auf Grund von Schmiedebergs†) Angaben über die Melanoidinsäure zu 0,16 Proz. der Substanz††) anschlägt, was etwas mehr

*) Zeitschr. f. phys. Chemie **29**, 155; **33**, 374.

) Ebenda **28, 603.

***) Beachtenswert ist, daß mir auch bei Untersuchung der sehr cystinreichen Hornspäne keine Schwierigkeiten erwachsen sind.

†) Archiv f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **29**, 1.

††) Nicht des Gesamtstickstoffs, wie Kutscher anzunehmen scheint.

als 1 Proz. des Gesamtstickstoffs entspricht. Um die entsprechende Größe muß sich, wenn dieses sekundäre Produkt nicht entfernt wird, die Diaminozahl erhöhen.

Hausmann hält dies nicht für einen schwer wiegenden Fehler, da er annimmt, daß die Melanoidinsäure der chromogenen Gruppe des Eiweißes entstammt, die bei Trypsinverdauung selbst als durch Phosphorwolframsäure fällbares Produkt erhalten wird. In der Tat hat Samuely*) für die künstlichen Melanine die Beziehung zu indolgebenden Gruppen des Eiweißes, somit zu der Tryptophangruppe nachweisen können.

Andererseits geht jedoch, wie seit Udránszky**) bekannt ist, und von Samuely genauer untersucht wurde, beim Kochen von Kohlehydraten mit Säure bei Anwesenheit von Amiden, aber auch von Ammonsalzen die Bildung von stickstoffhaltigen Huminkörpern vor sich, für die eine Beziehung zu basischen Kernen des Eiweißes sehr unwahrscheinlich ist.

Entsprechend der Unmöglichkeit, jetzt schon im einzelnen Falle über die Herkunft dieses Stickstoffs ein Urteil abzugeben, empfiehlt es sich, ihn getrennt zu bestimmen, was ich in derselben Weise wie gleichzeitig Osborne und Harris ausführte, nämlich durch Bestimmung des im Magnesiaschlamm nach völligem Auswaschen verbleibenden Stickstoffs.

Zwar stellte sich bei der notwendigen Einengung des Filtrates regelmäßig wieder eine geringe Braunfärbung ein, ebenso bildeten sich wieder spärliche braune Niederschläge, aber in diesen war niemals quantitativ Stickstoff nachzuweisen; ebenso sind die schwarzen Massen, welche sich bei der Zersetzung mit Salzsäure an der Steigröhre niederschlagen, stickstofffrei.

Bei meinen Versuchen hat sich für den im kristallisierten Serumalbumin enthaltenen Melaninstickstoff der gleiche Wert ergeben, den Hausmann nach Schmiedebergs Angaben berechnet hat. Die Werte, welche die anderen von mir untersuchten Eiweißkörper in bezug auf den Melaninstickstoff aufweisen, übersteigen jedoch die beim Serumalbumin gefundene Menge. In der Regel fanden sich 1 bis 2 Proz., im höchsten Falle bei Hornspänen 2,6 Proz. des Gesamtstickstoffs in dieser Form. Die Erhöhung der Diaminozahl um diese Größe kann bei den echten tierischen Eiweißstoffen keinen erheblichen Irrtum veranlassen.

Eine Entscheidung über die Bedeutung dieser Fraktion ist, wie Hausmann schon hervorgehoben hat, von Versuchen zu erwarten, bei denen die Melanin- und Huminbildung vermieden wird.

*) Diese Beiträge 2, 355.
**) Zeitschr. f. phys. Chemie 12, 389.

III. Der Monaminostickstoff.

Die Genauigkeit, mit der der Stickstoff dieser Fraktion ermittelt wird, hängt in erheblichem Grade von der Zuverlässigkeit der Bestimmung des Diaminostickstoffs ab. Nur macht sich hier der durch die Löslichkeit der Diaminosäuren-Phosphorwolframate bedingte Fehler angesichts des hohen Gesamtbetrags viel weniger geltend. Kann man den Fehler, der bei der Diaminofraktion unterläuft, auf 5 bis 10 Proz. des gesamten Diaminostickstoffs schätzen, so entfällt auf die Monaminosäurefraktion ein fehlerhaftes Plus von höchstens 1 bis 2 Proz. des gesamten Monaminostickstoffs, d. h. statt 60 Proz. Monaminostickstoff findet man schlimmstenfalls 61 bis 62 Proz. — ein Fehler, der die Beurteilung der Stickstoffverteilung nicht ernstlich stört.

Die Ausführung dieser Bestimmung hat im wesentlichen die Bedeutung einer Kontrolle für die Richtigkeit der gesamten Analyse, da sich die gefundenen Werte bei gelungener Ausführung zu dem bekannten Stickstoffgehalte des betreffenden Eiweißstoffes summieren müssen. Sie bietet aber wegen des hohen Salzgehaltes der Flüssigkeit bei der Zersetzung nach Kjeldahl öfter Schwierigkeiten und mißlingt nicht selten. Ich selbst habe sie regelmäßig durchgeführt.

Die Zersetzung ließ sich am besten bei Zusatz von Quecksilber oder Platinchlorür und ganz allmählich erfolgendem Zusatz von Kjeldahlsäure zu Ende führen.

IV. Über die Stickstoffverteilung in einigen Proteinstoffen.

Bei Nachprüfung der Resultate Hausmanns ging ich natürlich zunächst von kristallinischen Eiweißkörpern aus, da nur hier genügende Gewähr für Identität der Präparate gegeben war.

a) Kristallisiertes Serumalbumin.

Das in bekannter Weise dargestellte, durch Osmose von Salz befreite, mit Alkohol koagulierte und mit Äther erschöpfte Präparat enthielt 14,60 Proz. Stickstoff.

Es wurden erhalten in Prozenten:

Amidstickstoff		0,95;	0,95
Melaninstickstoff		C,16;	0,13
Diaminostickstoff		5,07;	4,66
Monaminostickstoff	8,96;	8,94;	8,63.

Im Mittel:

Amidstickstoff	0,95
Melaninstickstoff	0,15
Diaminostickstoff	4,86
Monaminostickstoff	8,81

Bei Berechnung dieser Zahlen auf den von Gürber und Michel ermittelten Stickstoffgehalt des reinen Serumalbumins



(15,93 Proz.) ergibt sich: Amidstickstoff = 1,01; Melaninstickstoff = 0,16; Diaminostickstoff = 5,30; Monaminostickstoff = 9,61. Hausmann findet für den Amidstickstoff 1,06, 0,95 und 1,01, was im Mittel auch 1,01 Proz. gibt. Für Diaminostickstoff konnte Hausmann, wie eingangs erwähnt, nicht zu konstanten Zahlen gelangen. Auch meine beiden Versuche zeigen eine große Verschiedenheit. Die Ursache dieser Unsicherheit bedarf noch der Aufklärung.

b) Edestin aus Hanfsamen.

Zur Verwendung kam ein von den Höchster Farbwerken bezogenes Präparat.

Es ergab sich in Prozenten ausgedrückt:

Amidstickstoff 1,80; 1,78
Melaninstickstoff 0,31; 0,26
Diaminostickstoff 6,90; 6,11
Monaminostickstoff . . . . 10,51; 10,51.

Daraus ergeben sich die nachstehenden Mittelzahlen, denen ich die von Hausmann und Osborne und Harris gefundenen Werte zur Seite stelle:

	Amidstickstoff	Melaninstickstoff	Diaminostickstoff	Monaminostickstoff
Hausmann . . .	1,90	7,07		10,19
Osborne u. Harris .	1,88	0,12	5,91	10,78
Gümbel	1,79	0,29	6,50	10,51

Auch hier ist die Übereinstimmung der Diaminozahlen unbefriedigend, wenngleich aus ihnen allenthalben der hohe Gehalt des Edestins an Eiweißbasen sicher hervorgeht.

c) Kasein.

Von den verwandten Kaseinpräparaten war das eine von Herrn Privatdozent Dr. Spiro hergestellt und mir zur Untersuchung gütigst überlassen, das andere war Caseinum purissimum von Grübler. Es ergeben sich für die lufttrockenen Präparate folgende Werte:

	Amidstickstoff	Melaninstickstoff	Diaminostickstoff	Monaminostickstoff
Kasein Spiro . . .	1,43	0,22	3,86	8,76
	1,49	0,24		
„ Grübler . .	1,49	0,24	3,88	8,96
	1,51			

Das Präparat von Grübler enthielt 14,20 Proz. Stickstoff. Rechnet man die von mir und ebenso die von Kutscher in seinem 3. und 4. Versuche gefundenen Werte auf den von Osborne und Harris zugrunde gelegten Stickstoffgehalt des Kaseins zu 15,62 Proz. um, so ergeben sich nachstehende Werte:

	Amidstickstoff	Melanin-stickstoff	Diamino-stickstoff	Monamino-stickstoff
Kutscher im Mittel .	1,60	0,23	3,87	10,14
Osborne und Harris .	1,65	—	3,46	—
Gümbel	1,64	0,31	4,25	9,82
Hausmann	2,10	1,84		11,93

Hausmanns Zahlen können sich unmöglich auf Kasein (wenigstens intaktes Kasein) beziehen. Sie zeigen allen übrigen gegenüber weit außerhalb der Fehlergrenzen gelegene Abweichungen. Es ist nicht gelungen, die Quelle dieses Irrtums sicherzustellen*).

d) Keratin.

Horn kam in Form von Drehspänen zur Verwendung. Dieselben wurden von den anhaftenden Verunreinigungen mechanisch sorgfältig befreit, zunächst mehrmals mit Wasser, dann mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Es wurden nur pigmentarme, weiße bis höchstens grauweiße Späne verarbeitet. Das Präparat enthielt 16,3 Proz. Stickstoff.

Es ergab sich in Prozenten;

für Amidstickstoff 1,18; 1,16
„ Melaninstickstoff 0,28; 0,56
„ Diaminostickstoff 2,97; 2,92
„ Monaminostickstoff . . . . 12,39; 11,24.

Im Mittel für:

Amidstickstoff 1,17
Melaninstickstoff 0,42
Diaminostickstoff 2,95
Monaminostickstoff . . . . 11,81.

e) Knorpel.

Das Präparat wurde nach Schmiedebergs Angaben aus der Nasenscheidewand des Schweines gewonnen. Nach sorgfältiger Reinigung wurden die Stücke mit der Fleischhackmaschine zerkleinert und auf dem Wasserbade getrocknet. Es wurde so eine bräunliche, sehr harte und spröde Masse erhalten, welche pulverisiert zur Verwendung kam. Der Stickstoffgehalt betrug 11,00 Proz.

Gefunden wurden Prozent:

für Amidstickstoff 1,35
„ Melaninstickstoff 0,36
„ Diaminostickstoff 1,35
„ Monaminostickstoff . . . . 7,95.

Da der Knorpel im wesentlichen eine Verbindung bzw. ein Gemenge von Collagen und Chondroitinschwefelsäureverbindungen darstellt, war es von Interesse, die Stickstoffverteilung des Knorpels mit jener des Leims einerseits, jener der Chondroitinschwefelsäure andererseits zu vergleichen.

*) Von den Präparaten, die Hausmann benutzt hat, waren nur das Kasein und der Leim käuflich bezogen.

Für die Untersuchung der Chondroitinschwefelsäure benutzte ich ein Präparat von chondroitinschwefelsaurem Kalium, das vor längerer Zeit von Herrn H. Schneider nach den Vorschriften von Schmiedeberg dargestellt worden war. Die bröcklige, leicht bräunliche Masse wurde, bei 110° getrocknet, pulverisiert in Angriff genommen.

Gefunden wurden Prozent:

Amidstickstoff	0,87; 0,83
Melaninstickstoff	0,24; 0,22
Diaminostickstoff	0,77; 0,82
Monaminostickstoff	0,52.

Im Mittel:

Amidstickstoff	0,85
Melaninstickstoff	0,23
Diaminostickstoff	0,79
Monaminostickstoff	0,52.

Die Beziehung zum Leim und zum Knorpel läßt sich am besten bei Umrechnung auf Gesamtstickstoff (= 100 Proz.) übersehen.

<table>
<tr><th></th><th>Amidstickstoff</th><th>Melanin-stickstoff</th><th>Diamino-stickstoff</th><th>Monamino-stickstoff</th></tr>
<tr><td>Knorpel</td><td>12,27</td><td>3,27</td><td>12,27</td><td>72,27</td></tr>
<tr><td>Leim (Hausmann)</td><td>1,61</td><td colspan="2">35,83</td><td>62,56</td></tr>
<tr><td>Chondroitinschwefelsaures Kalium</td><td>35,27</td><td>9,54</td><td>32,78</td><td>21,57</td></tr>
</table>

Auf die daraus sich ergebenden Beziehungen ist hier nicht der Ort einzugehen.

V. Schlußbemerkungen.

Die hier mitgeteilten Tatsachen führen in betreff des Wertes des Hausmannschen Verfahrens zu einem Urteil, das sich dem von Hausmann selbst ausgesprochenen nähert. Was seine Genauigkeit anbetrifft, so gibt es für Amidstickstoff sehr scharfe, für den Monaminostickstoff annähernd genaue, für den Diaminostickstoff bis zu 0,8 Proz. schwankende, meist zu niedrige Werte. Dieser Umstand berechtigt zu der Frage, ob dem Verfahren überhaupt ein Wert für den von Hausmann ins Auge gefaßten Zweck, die Charakterisierung der Proteinstoffe, zukommt.

Die Erfahrung hat darüber bereits entschieden. Wie oben ausgeführt wurde, können die Amidzahlen den leichtest bestimmbaren zuverlässigen Konstanten zur Seite gestellt werden. Aber auch die Monaminowerte sind trotz der ihnen anhaftenden Fehler genau genug, um eine Vorstellung über den Gehalt eines Proteinstoffes an dieser Art Stickstoffbindung zu ermöglichen.

In betreff der Diaminosäuren, die einem erheblichen Fehler unterliegen, kann die Frage nur so gestellt werden, ob die Differenzen

im Gehalt der Proteide an Diaminosäuren groß genug sind, um außerhalb der Fehlergrenzen der Methode zu fallen. Die bisher in dieser Richtung vorliegenden Versuche gestatten die Frage für eine erhebliche Zahl von Proteiden zu bejahen; ich verweise in dieser Richtung namentlich auf die Erfahrungen von Osborne und Harris an Pflanzeneiweißkörpern, wo die Verschiedenheiten gerade in dieser Art der Stickstoffbindung außerordentlich groß sind.

Von Bedeutung ist, daß das Verfahren über Ungleichheiten des Baues von Proteinstoffen Aufschluß gibt, wo die Analyse eher auf Identität hinweist. So konnte E. P. Pick*) bei Protoalbumose und Heteroalbumose des Fibrins trotz annähernd gleicher Zusammensetzung mittels der Bestimmung der Stickstoffverteilung eine wesentliche Verschiedenheit des Baues nachweisen; und Osborne und Harris fanden darin einen sicheren Anhaltspunkt für die Unterscheidung sonst scheinbar identischer Pflanzenglobuline.

Solange es nicht möglich sein wird, mit kleinen Mengen von Proteiden eine quantitative Bestimmung sämtlicher Spaltungsprodukte durchzuführen, wird das handliche Hausmannsche Verfahren ein wertvolles Mittel zur Orientierung über den Bau von Proteinstoffen bleiben. Von besonderem Werte ist es für die Untersuchung der einfacheren Abkömmlinge des Eiweißes, der Albumosen, Peptone usw., zumal da hier, wo die Zahl der zum Moleküle zusammentretenden Kerne eine geringere ist, die Schwächen des Verfahrens in eben dem Maße zurücktreten, als sich die Unterschiede in dem Gehalt an verschiedenen Arten von Stickstoffbindung stärker geltend machen.

*) Zeitschr. f. phys. Chemie 28, 219.

Kürzere Mitteilungen.

2. Über die Ausscheidung des Phlorhizins.

Von Dr. Kōtarō Yokota.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Die Frage nach der Ausscheidung des Phlorhizins durch den Harn ist in verschiedenem Sinne beantwortet worden. Daß es, wenigstens zum Teil, unverändert im Harn erscheint, ist schon von v. Mering*) beobachtet worden, Külz und Wright**) haben es zuerst kristallinisch aus dem Harn erhalten. Cremer und Ritter***) fanden den Harn von mit Phlorhizin behandelten Kaninchen nach Vergärung linksdrehend und zwar etwa in dem Maß, als die angewandte Phlorhizinmenge bei quantitativer Ausscheidung erwarten ließ. Aus der beobachteten Linksdrehung würden sich nach Cremer†) für die Ausscheidung Phlorhizinmengen berechnen, die 80 bis 125 Proz. der eingespritzten Menge entsprächen. Hingegen bezweifelt Gr. Lusk††) auf Grund von Versuchen, bei denen Phlorhizinharn mit Säure gekocht und die Reduktionssteigerung bestimmt wurde, daß Phlorhizin als solches in wesentlicher Menge in den Harn übertritt. Cremer†††) hat dann in sorgfältigen Versuchen nach einem Wege gesucht, diesen Widerspruch aufzuklären. Er konnte sicherstellen, daß im Harn von Phlorhizinkaninchen neben Phlorhizin eine linksdrehende Substanz auftrat, die nach der Spaltung Rechtsdrehung und Reduktion gab, doch nicht in dem Maße, als dem Phlorhizin entsprochen hätte.

Während sonach anscheinend darüber kein Zweifel besteht, daß überhaupt Phlorhizin unverändert im Harn auftreten kann, gehen die Meinungen darüber, in welchem Umfang dies geschieht, auseinander. Ich habe mich bemüht, diese Frage dadurch zu entscheiden, daß ich das in den Harn übergehende Phlorhizin quantitativ zu bestimmen suchte.

Das verwendete Phlorhizin war durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Wasser und 96 proz. Alkohol gereinigt. Es schmolz bei 108° C, wurde bei 130° C wieder fest und schmolz dann bei höherem Erhitzen unter Zersetzung. Zur Isolierung aus dem Harn benützte ich seine Fällbarkeit durch ammoniakalische Bleiacetatlösung und seine Löslichkeit in Aceton. Daß die Fällung durch ammoniakalische Bleilösung quantitativ ist, ergab sich aus zwei Vorversuchen.

---

*) Zeitschr. f. klin. Medizin 16, 431.
**) Zeitschr. f. Biol. 27, 192.
***) Das. 28, 459; 29, 256.
†) Das. 36, 115.
††) Das. 36, 98.
†††) Das. 36, 115.

0,15 g Phlorhizin wird in 100 ccm Wasser unter Zusatz einiger Tropfen Ammoniak gelöst. Auf Zusatz von ammoniakalischer Bleiacetatlösung fällt es in weißen Flocken. Der Niederschlag, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, liefert 0,1496 g Phlorhizin. In einem zweiten Vorversuche wurde statt 0,1 g 0,103 g wiedergefunden.

Auch Versuche, in denen zu Kaninchenharn Phlorhizin gesetzt wurde, gaben ein recht befriedigendes Resultat. Das Verfahren war dasselbe, das ich später bei Untersuchung von Phlorhizinharnen benutzte. Es sei deshalb ausführlicher mitgeteilt.

Etwa 100 ccm frischen, filtrierten Kaninchenharns werden mit der abgewogenen Menge Phlorhizin versetzt und von Phosphaten und Sulfaten durch Fällen mit Barytmischung befreit. Dann wird mit ammoniakalischer Bleiacetatlösung gefällt. Es erfolgt reichlichere Fällung, als dem vorhandenen Phlorhizin entspricht, weil andere Harnbestandteile mitgefällt werden. Dieser Niederschlag wird nach dem Absetzen auf dem Filter gesammelt, mit destilliertem Wasser ausgewaschen, in einen Erlenmeyerkolben gespritzt, unter Wasser fein zerteilt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Man filtriert heiß, wäscht nach und dampft auf dem Wasserbade in einer Kristallisierschale ein. Scheidet sich, wie dies die Regel ist, noch Schwefelblei ab, so wird abfiltriert. Der Abdampfrückstand, der eine erhebliche Menge von Kochsalz enthält, wird von diesem durch Behandeln mit Aceton, welches das Phlorhizin löst, getrennt. Nach Verdunsten des Acetons wird der Rückstand mit Wasser aufgenommen und die Lösung abgedampft, wobei neuerdings Abscheidung von Bleisulfidpartikelchen und daneben einer harzartigen bräunlichen Substanz, in einzelnen Fällen recht reichlich, eintritt. Diese Verunreinigungen müssen durch wiederholtes Aufnehmen des Abdampfrückstandes mit warmem Wasser und darauffolgendes Filtrieren beseitigt werden. Das Filtrat wird schließlich in einer gewogenen Kristallisierschale auf dem Wasserbade zur Trockene gebracht, der Rückstand nochmals mit Aceton aufgenommen, langsam verdunstet und gewogen. Abwesenheit von Kochsalz muß mikroskopisch kontrolliert werden, zumal da das Phlorhizin, wenn es in größerer Menge vorhanden ist, beim Verdampfen des Acetonextraktes ebenfalls in Kristallen anschießt.

Nachstehend zwei Versuchsbelege:

1. Es werden 0,5 g Phlorhizin im Kaninchenharn gelöst, 0,505 g wiedergefunden; 2. es werden 0,1 g Phlorhizin im Kaninchenharn gelöst, 0,108 g wiedergefunden.

Entsprechend dem Umstand, daß der aus Harn erhältliche Bleiniederschlag immerhin noch etwas acetonlösliche Substanz enthält, findet man auf diesem Wege etwas zu hohe Werte. Der Fehler wird relativ um so größer sein, je geringer der Gehalt an Phlorhizin ist. Ich habe daher in den Tierversuchen mehrmals das erhaltene und gewogene Rohphlorhizin in Phloretin übergeführt und dieses neuerdings gewogen. Zu diesem Zwecke wird das aus dem Harn erhaltene Phlorhizin in kochendem Wasser gelöst, dann mit soviel Schwefsäure versetzt, daß die Lösung 20proz. wird, und auf dem Wasserbade erhitzt, bis sich das Phloretin in grobflockiger Form ausscheidet. Nach dem Erkalten wird das gewöhnlich etwas gefärbte Phloretin auf dem Filter gesammelt, mit Wasser bis zum Verschwinden der sauren Reaktion ausgewaschen, im Trockenschrank bei 90 bis 100° C getrocknet und gewogen. Phlorhizin liefert theoretisch be-

rechnet 62,8 Proz. Phloretin. In meinen Versuchen betrug die aus käuflichem Phlorhizin mittels Säure abgespaltene wägbare Phlorhizinmenge durchschnittlich 54,6 Proz.; 0,5 g reines Phlorhizin ergab in 3 Versuchen 0,290, 0,266, 0,263 g Phloretin, d. h. 58,0, 53,2 und 52,6 Proz., im Mittel 54,6 Proz.

Die Reinheit des nach Phlorhizindarreichung aus dem Harn auf obigem Wege erhaltenen Phloretins wurde durch die Bestimmung des Schmelzpunktes kontrolliert.

Ein Kaninchen von 3600 g Körpergewicht erhielt 0,943 g Phlorhizin subkutan. Binnen 6 Tagen wurden 1610 ccm Harn entnommen, in welchem annähernd die ganze Phlorhizinmenge wiedergefunden wurde. Durch Säurespaltung wurde Phloretin erhalten, welches nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Äther und aus Alkohol bei 250° C schmolz.

In einem zweiten Versuche (s. Nr. 4 der folgenden Tabelle) wurde durch Spaltung ein nach Umkristallisieren bei 255° schmelzendes Phloretin erhalten.

Im nachstehenden teile ich die Resultate meiner Tierversuche mit. Sie wurden ausschließlich an Kaninchen angestellt. Das Phlorhizin wurde subkutan injiziert. Der Harn wurde durch 2 bis 5 Tage gesammelt. Der Trockenrückstand des gereinigten Acetonextrakts ist als „Rohphlorhizin“ angeführt. Daneben das Gewicht des daraus erhaltenen Phloretins. Die unter „Wiedererhalten“ angegebene Prozentzahl ist in Versuch 2, 3 und 5 aus dem abgespaltenen Phloretin, in Versuch 1 und 4 aus dem Rohphlorhizin berechnet. (Da letztere Werte minder genau sind, habe ich sie in Klammern gesetzt.) Die Menge des aus Phlorhizin durch Säurespaltung erhältlichen Phloretins ist dabei auf Grund der oben erwähnten Versuche zu 54,6 Proz. angenommen.

Nr.	Gewicht des Tieres g	Phlorhizin g	Harnmenge ccm	Wiedererhalten				Bemerkungen
				Rohphlorhizin g	Phlorhetin g	Entsprechend Phlorhizin g	Proz.	
1	2500	subkutan 0,498	250	0,394	—	—	(79,1)	
2	2150	0,408	200	0,392	0,208	0,3778	92,8	Harn enthält 1 Proz. Zucker
3	2063	0,802	340 380 580	0,590 0,180 0,062	0,280 0,062 0,026	0,6739	84,0	„ „ 0,8 „ „ „ 0,25 „ „ „ keinen Zucker
4	2300	1,852	1725	1,705	—	—	(92,0)	
5	2110	per os 1,505	120 380 800 425	0,09 0,25 0,352 0,389	— 0,120 0,140 0,120	0,696	46,2	Harn enth. 0,15 Proz. Zucker „ „ 0,12 „ „ „ 0,09 „ „ „ keinen Zucker

Wie aus diesen Versuchen zu ersehen, findet sich beim Kaninchen das subkutan beigebrachte Phlorhizin fast der ganzen Menge nach im Harn wieder. Der sich ergebende Fehlbetrag von 10 bis 20 Proz. dürfte auf Rechnung der zahlreichen vorzunehmenden Operationen zu stellen sein. Jedenfalls erscheint diese Annahme als die nächstliegende. Minder wahrscheinlich ist, daß das gesamte Phlorhizin nicht als solches, sondern

in Form einer andern Verbindung in den Harn übergeht. Da die Menge des gefundenen Rohphlorhizins annähernd jener des abgespaltenen Phloretins entspricht, so müßte in diesem Falle die weitere Annahme gemacht werden, daß diese supponierte Verbindung etwa das gleiche Molekulargewicht und auch Eigenschaften wie das Phlorhizin selbst haben müßte, als: Fällbarkeit mit ammoniakalischer Bleilösung, Löslichkeit in Aceton, Spaltbarkeit durch 20proz. Schwefelsäure — eine Annahme, die wenig Wahrscheinlichkeit für sich hat.

Im ganzen muß ich daher ebenso wie Paul Meyer*) der Meinung Ausdruck geben, daß für die subkutane Injektion von Phlorhizin die von Cremer und Ritter geäußerte Meinung, der zufolge das Phlorhizin quantitativ in den Harn übergeht, der Wahrheit sehr nahe kommt, womit natürlich das Vorkommen von geringen Mengen linksdrehender, möglicherweise sogar durch Säure unter Phloretinbildung spaltbarer Derivate nicht geleugnet werden soll.

Bei Applikation vom Magen aus ist die Menge des ausgeschiedenen Phlorhizins viel geringer. Auch wird in diesem Fall das Rohphlorhizin minder rein erhalten. Es läßt sich daher für das vom Darm aus resorbierte Phlorhizin nicht mit gleicher Sicherheit wie nach subkutaner Injektion behaupten, daß es als solches im Harn erscheint.

---

*) Diese Beiträge 2, 225.

XVIII.

Chemische Untersuchungen der lymphatischen Organe.

Von **Ivar Bang.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium zu Lund, Schweden.)

Vierte Mitteilung.

In drei vorhergehenden Abhandlungen*) habe ich meine Untersuchungen über einige Nucleoproteide der lymphatischen Organe mitgeteilt. Die nachstehende letzte Mitteilung soll dazu eine Ergänzung bilden**). Sie besteht aus zwei Teilen, wovon der erste Untersuchungen über die Thymusnucleinsäuren umfaßt, während der zweite Teil das nucleinsaure Histon der Gänseblutkörperchen behandelt. Keine von diesen Untersuchungen ist zu Ende geführt worden. Da ich aber nicht beabsichtige, dieses Gebiet weiter zu bearbeiten, habe ich mich entschlossen, meine Erfahrungen schon jetzt zu veröffentlichen.

1. Die Thymusnucleinsäuren.

Die Nucleinsäure des aus der Thymusdrüse dargestellten nativen Nucleinates enthält meiner früheren Untersuchung zufolge 2 Teile Adenin auf 1 Teil Guanin. Da ich aber damals auch gefunden habe, daß die Nucleinsäure nur zwei Moleküle Purinbasen enthält, habe ich den Schluß gezogen, daß zwei verschiedene Nucleinsäuren, wovon die eine 1 Mol. Adenin + 1 Mol. Guanin und die andere 2 Mol. Adenin enthält, vorliegen, eine Auffassung, die überdies sehr gut zu den gefundenen analytischen Werten stimmte. Weiter habe ich die Annahme gemacht, daß das eigentliche nucleinsaure Histon die erste Nucleinsäure, „die Normalsäure“, enthält, das Parahiston dagegen die Adenylsäure. Über die dort in Aussicht gestellten weiteren Untersuchungen soll nachstehend berichtet werden.

---

*) Diese Beiträge 4, 115, 331 u. 362.

**) Die inzwischen erschienenen Arbeiten von Huiskamp und Malengreau lassen sich unschwer mit meinen Befunden in Einklang bringen und geben zu keiner Bemerkung meinerseits Anlaß.

Organismus bekannt. Gonnermann*) führte den Nachweis, daß die dunkle Färbung der Rübensäfte auf Entstehung von Homogentisinsäure aus Tyrosin beruht und Bertel**) zeigte, daß bei Pflanzenkeimlingen sich reichlich Tyrosin bildet, das in die Wurzelspitzen wandert und dort durch ein Enzym in Homogentisinsäure verwandelt wird. Baumann***) hatte beim Alkaptonuriker bereits das Tyrosin als Quelle der Homogentisinsäure erkannt und in neuerer Zeit haben Falta und Langstein†) den Beweis erbracht, daß auch Phenylalanin beim Alkaptonuriker in Homogentisinsäure übergeht.

Untersuchungen über das Verhalten einer Reihe von amidsubstituierten Körpern (fette und aromatische Amide, Anilide und Imide) gegenüber tierischen und pflanzlichen Fermenten sowie gegen das Histozym der Leber und Niere des Schafes sind von Gonnermann††) ausgeführt worden.

Er fand Verseifung von Acetamid, Formanilid, Acetanilid, Succinimid durch Trypsin (für das Acetamid von Schwarzschild†††) bestritten), ferner Zerlegung von Formamid, Benzamid, Formanilid durch das Histozym der Leber und Niere vom Schaf; Acetamid und Salicylamid wurde nur vom Histozym der Niere angegriffen. Über die Größe der erfolgten Spaltung macht Gonnermann keine Angabe, da er sich darauf beschränkte, die stattgefundene Spaltung qualitativ (durch den Nachweis der abgespaltenen Säure) zu erweisen.

In allerjüngster Zeit haben Langstein und Neuberg*†) über Versuche berichtet, in denen die Darreichung von Alanin an Kaninchen zu einer Glykogenvermehrung führte. Da sie gleichzeitig Milchsäure im Harne der Versuchstiere nachweisen konnten,

*) Gonnermann, Die farbebedingende Substanz dunkler Rübensäfte. Pflügers Archiv 82, 289.

**) Bertel, Über Tyrosinabbau in Keimpflanzen. Berichte der d. botan. Gesellschaft 1902.

***) Baumann und Wolkow, Über das Wesen der Alkaptonurie. Zeitschr. f. physiol. Chemie 15, 228.

†) Falta und Langstein, Die Entstehung von Homogentisinsäure aus Phenylalanin. Zeitschr. f. physiol. Chemie 37, 513.

††) Gonnermann, Über die Verseifbarkeit einiger Säureamide und Säureanilide durch Fermente. Pflügers Archiv 89, 493. — Ders., Über die Verseifbarkeit einiger Säureimide (Diamide) und Aminsäuren durch Fermente. Pflügers Archiv 95, 278.

†††) M. Schwarzschild, Über die Wirkungsweise des Trypsins. Diese Beiträge 4, 155.

*†) Langstein und Neuberg, Über einen Fall von Desamidierung im Tierkörper, zitiert nach Biochem. Centralblatt 2, Nr. 7, 1904.

nehmen diese Autoren an, daß die Glykogenbildung direkt unter Desamidierung des Alanins erfolge.

II.

Neuere Versuche von Stolte*), die bei intravenöser Einbringung von verschiedenen Aminosäuren beträchtliche Differenzen in der Geschwindigkeit ihrer Umwandlung zu Harnstoff erkennen ließen, legten den Gedanken nahe, auch das Verhalten der einzelnen Organe auf ihre Fähigkeit zu prüfen, aus verschiedenen stickstoffhaltigen Verbindungen Ammoniak abzuspalten und die Größe dieser Abspaltung festzustellen.

Meine Versuche wurden in folgender Weise angestellt:

Die möglichst frisch aus dem Schlachthaus bezogenen Organe wurden gut zerkleinert und zerrieben, von dem Organbrei bestimmte Mengen (meist 50 g) in eine gut schließende Glasbüchse mit eingeriebenem Stöpsel abgewogen, mit physiologischer (0,9 proz.) Kochsalzlösung versetzt (100 ccm) und mit einer gewogenen Menge der zu prüfenden Substanz beschickt. Als Antiseptikum wurde Toluol benutzt. In den ersten Versuchen wurde das Gemisch öfters durchgeschüttelt, später aber, um ganz sichere antiseptische Wirkung zu erzielen, wenigstens eine Stunde lang mit der Schüttelmaschine geschüttelt. Dabei fügte ich für je 50 g des Gemisches zunächst nur 2 ccm Toluol hinzu, welche Menge zur Sättigung und Sicherung der Antisepsis völlig ausreicht. Dann wurde mit Toluol überschichtet und die Proben kamen bis zur Verarbeitung für verschieden lange Zeit in den Brutschrank.

Als Organe kamen in Verwendung: Leber, Niere, Lymphdrüsen, Nebennieren, Hoden, Pankreas, Darmschleimhaut, Milz, Muskel. Sie stammten, mit wenigen Ausnahmen, die besonders angegeben sind, sämtlich vom Rind. Von den stickstoffhaltigen Substanzen wurden außer den Monaminosäuren auch Amide, wie Asparagin, Glutamin, Acetamid, Harnstoff, sodann Glykosamin**) und außerdem Harnsäure in den Kreis der Untersuchung gezogen.

Zur Bestimmung des Ammoniaks diente folgendes Verfahren:

Der Organbrei wurde behufs Lösung eventuell gebildeter phosphorsaurer Ammon-Magnesia in der Glasbüchse mit ammoniakfreier Essigsäure bis zur deutlich sauren Reaktion versetzt, damit gut durchgeschüttelt, in einen Maßzylinder gebracht, mit 40 ccm einer 8 proz. (in späteren Versuchen erwies sich auch eine 5 proz. Lösung als hinreichend) Tanninlösung versetzt, durch Nachwaschen der Büchse mit destilliertem Wasser auf etwa 300 bis 350 ccm gebracht und aus dem Zylinder in eine Porzellanschale übertragen. Der Zylinder wurde mit ungefähr 100 ccm Wasser in kleinen Portionen nachgespült, das Waschwasser mit dem Organbrei vereinigt, dann unter stetem Rühren aufgekocht, erkalten gelassen und die Flüssigkeit samt Niederschlag quantitativ in einen Meßzylinder gespült

*) K. Stolte, Über das Schicksal der Monaminosäuren im Tierkörper nach Einführung in die Blutbahn. Diese Beiträge 5, 15.

**) Salzsaures Glykosamin stellte ich mir in bekannter Weise aus Chitin dar; wo ich im folgenden von Glykosamin schlechtweg rede, ist immer salzsaures Glykosamin gemeint.

und (durch Nachwaschen der Schale) auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. Dasselbe betrug gewöhnlich 400 ccm bei Anwendung von Organmengen bis zu 50 g. Hierauf wurde wenigstens zweimal*) durch ein (meist doppeltes) Filter filtriert und vom Filtrate eine abgemessene Menge — niemals weniger als 150, meist 200 ccm — zur Bestimmung des Ammoniaks verwendet. Dasselbe wurde durch Destillation mit MgO im Vakuum bei niederer Temperatur (40 bis 45°) ausgetrieben und in $^{n}/_{10}$-H_2SO_4 aufgefangen. Bei gut funktionierendem Vakuum ist in 2 bis 3 Stunden alles Ammoniak übergegangen.

Das hier geschilderte Verfahren, Flüssigkeit samt Niederschlag zu messen, erwies sich als zweckmäßiger und wenigstens als ebenso genau, wie das Auswaschen des Eiweißniederschlages, das sehr zeitraubend und niemals erschöpfend ist. Wie ich mich schon in früheren Versuchen**) überzeugt habe, ist der Fehler, der durch das Gleichsetzen des spezifischen Gewichtes des Niederschlages mit dem des Wassers begangen wird, sicher nicht größer, als wenn man in der gewöhnlichen Weise verfährt, vorausgesetzt, daß die Masse des Niederschlags gegenüber dem Gesamtvolumen genügend klein (die Verdünnung also genügend groß) ist. Kleine Abweichungen von der hier beschriebenen Methodik sollen bei den einzelnen Versuchen genau angegeben werden.

Ich lasse nun das Ergebnis der Versuche folgen, tabellarisch geordnet nach den einzelnen Organen; die angegebenen Zahlen sind immer auf das Gesamtvolumen berechnet.

Versuch I.

Leber.

Dieser Versuch weicht von den späteren insofern ab, als eine größere Menge Organ zur Verarbeitung gelangte; es wurden je 150 g Leber am 17. XI. angesetzt und zwar

a) ohne Zusatz
b) mit Zusatz von 0,85 g Glykokoll
c) „ „ „ 0,5 „ Tyrosin
d) „ „ „ 0,5 „ salzsaurem Glykosamin

} + 200 ccm physiologischer Kochsalzlösung + Toluol

Die Proben wurden am 19. XI. verarbeitet (Verdünnung auf 1000 ccm).

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		b) Glykokoll		c) Tyrosin		d) Glykosamin	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
39 Stunden	40,8	57,12	40,0	56,2	43,64	61,1	47,3	66,23

*) Dies hat den Zweck, eine möglichst gleichmäßige Konzentration zu erzielen.

**) Unveröffentlichte Versuche. Bei Bestimmung des Blutzuckers nach Abeles bediente ich mich desselben Verfahrens; Kontrollversuche hatten eine sehr gute Übereinstimmung ergeben; allerdings ist es hier fast unmöglich, den Bluteiweißniederschlag quantitativ in das Meßgefäß zu bringen; deshalb wurde die Schale für sich und dann mit den Resten des anhaftenden Niederschlages gewogen und die Differenz dem genau abgemessenen Volumen der Flüssigkeit hinzuaddiert.

Versuch II.

Leber.

Je 50 g zerkleinerter Leber werden am 20. XI. in den Brutschrank gestellt und zwar:

a) 2 Proben ohne Zusatz,
b) 2 „ mit 0,7 g. eine Probe mit 0,5 g Glykokoll,
c) 2 „ „ 1,2 „ salzsaurem Glykosamin,
d) 1 Probe „ 1,0 „ Harnsäure und einigen Tropfen Na_2CO_3.

Die erste Reihe der Proben wird verarbeitet am 25. XI., die zweite am 30. XI.

A.

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		b) Glykokoll		c) Glykosamin		d) Harnsäure	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
5 Tage	32,26	45,16	35,2	49,28	44	61,6		

B.

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		b) Glykokoll		c) Glykosamin		d) Harnsäure	
9 Tage	65,45	91,6	60,9	85,8	37,1	51,9	92,35	129,2

Versuch III.

Leber.

Je 45 g Leber werden am 21. XII. angesetzt und zwar:

a) 5 Proben ohne Zusatz
b) 3 „ mit 0,3 g Glykokoll
c) 2 „ „ 0,5 „ salzsaurem Glykosamin
(Zu einer derselben wird im Verlaufe der Digestion am 8. I. die äquivalente Menge Na_2CO_3 hinzugefügt.)
d) 2 Proben mit 0,5 g Asparagin
e) 1 Probe „ 0,7 „ Harnsäure
f) 1 „ „ 1,0 „ Harnstoff
g) 1 „ „ 0,4 „ Cystin

+ 100 ccm 0,9 proz. Kochsalzlösung + Toluol (mit der Schüttelmaschine eine Stunde geschüttelt).

A. Die am 8. I. verarbeiteten Proben ergaben:

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		b) Glykokoll		d) Asparagin		f) Harnstoff	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
18 Tage	23	32,2	28	39,2	60	84,0	30,6	42,84

B. Die am 15. I. verarbeiteten Proben ergaben:

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		b) Glykokoll		e) Harnsäure		g) Cystin	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
25 Tage	27,67	38,73	29,93	41,9	28,29	39,6	32,59	45,62

C. Die am 21. I. verarbeiteten Proben ergaben:

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		b) Glykokoll		c) Glykosamin	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
32 Tage	32,94	46,0	35,0	49,0	37,8	52,9

D. Die am 22. I. verarbeiteten Proben ergaben:

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		a) ohne Zusatz (Kontrollprobe)		c) Glykosamin (nachträglich neutralisiert)		d) Asparagin	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
33 Tage	31,64	44,29	31,64	44,29	38,96	54,54	70	98.0

Versuch IV.

Leber.

Je 45 g Leber werden am 21. I. angesetzt und zwar:

a) 2 Proben ohne Zusatz
b) 1 Probe mit 0,45 g Leucin
c) 1 „ „ 0,4 „ salzs. Phenylalanin*) (genau neutralisiert mit Na_2CO_3)
d) 1 „ „ 0,4 „ Acetamid
e) 1 „ „ 0,5 „ Harnstoff + $CaCO_3$
f) 1 „ „ 0,4 „ Glutamin**)
g) 1 Probe wurde gekocht und nachher mit 0,2 g Glutamin versetzt
h) 1 Probe mit 0,5 g Tyrosin
i) 1 „ „ 20 ccm einer Lösung von milchsaurem Ammon, die 0,2506 Proz. Ammoniak-N enthielt

} + 100 ccm 0,9 proz. Kochsalzlösung + Toluol (mit der Schüttelmaschine 1½ Stunden geschüttelt).

A. Ergebnis der am 28. I. verarbeiteten Proben:

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		d) Acetamid		f) Glutamin		h) Tyrosin	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
6½ Tage	24,58	34,41	33,23	46,5	57,4	80,36	23,3	32,62

*) Das salzsaure Phenylalanin stellte ich mir aus Benzoylphenylalanin dar, das mir Herr Dr. Langstein freundlichst überlassen hatte, das Benzoat wurde mit der 120fachen Menge 10proz. Salzsäure durch 8 Stunden gekocht, dann die Salzsäure und die Hauptmenge der Benzoësäure mit Wasserdampf verjagt, endlich zur Entfernung des Benzoësäurerestes mit Äther ausgeschüttelt, filtriert und zur Kristallisation eingedampft. Die Kristalle wurden abgesaugt, mit konzentrierter Salzsäure, dann mit Alkohol gewaschen und endlich aus Alkohol, dem etwas Wasser zugesetzt war, umkristallisiert.

**) Reines Glutamin verdanke ich der Güte der Herren Proff. E. Schulze und Winterstein in Zürich.

B. Ergebnis der am 2. II. verarbeiteten Proben:

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		b) Leucin		c) Phenylalanin	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
12 Tage	27,33	38,26	31,04	49,66	27,7	38,78

B. Ergebnis der am 2. II. verarbeiteten Proben:

Dauer der Digestion	e) Harnstoff + $CaCO_3$		g) gekochte Probe + Glutamin		i) milchsaures Ammon (zugesetzt 50,12 mg N)	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
12 Tage	26,3	36,8	26,4	36,9	64 (dem Zusatz entsprechen 35,8)	89,60

Im Anschlusse an die Leberversuche möge noch ein Versuch mitgeteilt werden, der zwar nicht ohne weiteres mit den übrigen vergleichbar — die Proben waren mit 9proz. Kochsalzlösung versetzt worden —, aber immerhin wegen ähnlicher Verhältnisse der Ammoniakspaltung von Interesse ist.

Versuch V.

Leber.

Je 50 g Leberbrei werden am 14. XII. angesetzt:

a) 4 Proben ohne Zusatz
b) 3 „ mit 0,4 g Glykokoll
c) 2 „ „ 0,7 „ salzsaurem Glykosamin (eine Probe neutralisiert)
d) 1 Probe „ 0,5 „ Asparagin
e) 1 „ „ 0,4 „ Tyrosin
f) 1 „ „ 0,2 „ Cystin
g) 1 „ „ 0,7 „ Harnsäure

} + 100 ccm 9proz. Kochsalzlösung + Toluol (1 Stunde mit der Schüttelmaschine geschüttelt).

Ergebnis der am 28. XII. untersuchten Proben A:

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		b) Glykokoll		c) Glykosamin		d) Asparagin	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
13 Tage	26	36,4	27,6	38,64	28,8	40,32	47	79,8

B. Ergebnis der am 6. I. untersuchten Proben:

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		b) Glykokoll		e) Tyrosin		g) Harnsäure	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
23 Tage	42,12	59,08	43,4	60,8	40,8	57,12	39,46	55,2

C. Ergebnis der am 14. I. untersuchten Proben:

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		b) Glykokoll		c) Glykosamin (neutralisiert)		f) Cystin	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
31 Tage	44,52	62,32	44,52	62,32	37,86	52	43,2	60,48

Die größere Anzahl von Versuchen mit Leberbrei wurde in der Erwartung angestellt, bei diesem mit besonderen Funktionen begabten Organe ein besonders auffallendes Resultat zu erhalten. Diese Erwartung hat sich nicht völlig erfüllt. Die Sättigung des Organbreis mit Toluol durch anhaltendes Schütteln scheint auf den Ablauf der Fermentwirkungen von besonders schädigendem Einfluß zu sein.

Daß die autolytische Spaltung wesentlich dadurch beeinträchtigt wird, geht schlagend aus dem Vergleiche des Versuchs II (in welchem nicht anhaltend geschüttelt wurde) mit den Versuchen III, IV und V hervor, in welchen selbst nach 30tägiger Autolyse die Ammoniakwerte nicht die Höhe erreichten wie in Versuch II nach 9 Tagen.

Von den Aminosäuren werden deutlich unter Ammoniakabgabe gespalten das Glykokoll (Versuch II A, III A u. D) und das Leucin (Versuch IV B); Cystin und Tyrosin scheinen nur schwer angreifbar zu sein (III B, V C u. I, IV A, V B); je einem positiven Versuch steht ein negativer gegenüber. Phenylalanin wurde gar nicht zerlegt.

Hingegen wird der Amid-Stickstoff des Asparagins und Glutamins vollständig als Ammoniak abgespalten.

In Versuch III A liefern 0,5 g Asparagin, die 46,65 mg Amid-N enthalten, 51,8 mg N (NH_3); hier scheint sogar ein kleiner Bruchteil des Aminosäurestickstoffs mit abgespalten worden zu sein. In Versuch III D, bei einer um 14 Tage längeren Digestion ergaben 0,5 g Asparagin 53,7 mg N (NH_3), also wieder völlige Abspaltung des Amid-N unter teilweiser Spaltung der Asparagin-

säure. In Versuch V spaltet die Leber aus 0,5 g Asparagin 43,4 mg N ab, also wieder fast den ganzen Amid-Stickstoff.

Ebenso verhält sich das Glutamin.

In Versuch IV A f lieferten 0,4 g Glutamin, die 38,34 mg Amid-N enthalten, 45,95 mg N (NH_3), es liegt hier also genau dasselbe Verhältnis wie beim Asparagin vor. Da sich das Verhalten dieser Amide, wie hier vorweg genommen werden soll, bei allen daraufhin untersuchten Organen zeigte, wurden Kontrollversuche angestellt, ob bei deren Zusammenbringen mit gekochten Organen unter sonst genau gleichen Bedingungen eine Ammoniakabspaltung zu beobachten ist*). Diese Versuche fielen völlig negativ aus. (Versuch IV B g und im Folgenden Versuch XII f.) Demnach kommt die Fähigkeit der Ammoniakabspaltung aus den Amiden der Asparagin- und der Glutaminsäure den Organen selbst zu.

In Hinblick auf die eben mitgeteilten Resultate erschien es interessant, auch das Verhalten anderer Amide zu untersuchen; als solche wurden Acetamid und Harnstoff gewählt. (Vers. IV A d u. III A f.) Es zeigte sich nun, daß die Leber einen Teil des Stickstoffs aus Acetamid abspalten kann, doch ist derselbe recht klein. Von Interesse ist die wenn auch unerhebliche Abspaltung von Ammoniak aus Harnstoff durch dasselbe Organ, das ja zugleich die Hauptstätte seiner Bildung ist. Daß Harnstoff durch Leberextrakte unter Ammoniakabspaltung zersetzt werden kann, hat schon Jacoby beobachtet; es steht nichts im Wege, diesen Vorgang als den Ausdruck eines reversiblen Prozesses zu betrachten.

Da in meinen Leberversuchen am Ende der Digestion stets saure Reaktion vorhanden war, schien mir eine Lockerung des Stickstoffs durch die Säurebildung nicht unmöglich; um nun die entstandene Säure schon im Momente ihres Auftretens unschädlich zu machen, stellte ich einen Versuch in der Weise an, daß dem Leberbrei neben dem Harnstoff von vorneherein eine größere Menge Calciumkarbonat (etwa 1 g) zugesetzt und die Mischung während der Digestion öfters geschüttelt wurde. Tatsächlich reagierte das jetzt erhaltene Autolysat alkalisch und ergab keine Ammoniakabspaltung aus Harnstoff. (Versuch IV B c.)

Besonderes Interesse beansprucht das Verhalten des Glykosamins; dasselbe wurde teils als salzsaures Salz, teils mit Na_2CO_3 neutralisiert (Versuch I d, II A c u. III C c) zugesetzt, teils im Ver-

*) Daß Asparagin, für sich in wässeriger Lösung mit MgO im Vakuum destilliert, kein Ammoniak abspaltet, hat schon Schwarzschild angegeben; ich kann dies auch für eine mit Essigsäure schwach angesäuerte, nachher kurz aufgekochte Asparaginlösung bestätigen.

laufe der Digestion mit der äquivalenten Menge Na_2CO_3 versetzt (IIIDc, VA). In allen Versuchen zeigte sich eine deutliche Abspaltung von Ammoniak, die ungefähr 0,1 g zersetztem Glykosaminchlorhydrat entspricht. Die Bedeutung dieses Vorganges soll an späterer Stelle im Zusammenhange mit den bei anderen Organen erhaltenen Resultaten besprochen werden.

Eine deutliche Ammoniakabspaltung zeigt auch die Harnsäure in Versuch IIB. Wie wir seit den Untersuchungen Wieners, Burian und Schurs u. a. wissen, gehen in den Organen die Prozesse der Harnsäure-Bildung und -Zerstörung nebeneinander her. Trotzdem in der Rinderleber die Harnsäurebildung überwiegt, kann es nicht befremden, unter den von mir gewählten Bedingungen ein Produkt ihres Zerfalles aufzufinden.

Daß Harnsäure in der Leber zerstört werden kann, haben übereinstimmend Versuche von Ascoli*), Chassevant und Richet**), M. Jacoby***), Wiener†) und Schwarz††) gezeigt; in der Mehrzahl dieser Versuche ist interessanter Weise ebenfalls die Bildung eines stickstoffhaltigen, amidartigen Körpers erwiesen, der in seinen Reaktionen dem Harnstoff sehr ähnelt, mit demselben jedoch nicht identisch ist. (Gottlieb, Loewi.)

Der Zusatz von milchsaurem Ammon in Versuch IVBi hatte den Zweck, festzustellen, ob zugesetztes Ammonsalz verschwindet. Es waren 50,12 mg N (NH_3) zugesetzt worden, die autolytisch abgespaltene N-Menge betrug, wie aus der Kontrollprobe a ersichtlich, 38,26 mg. Wäre N in festere Bindung übergegangen, so hätten sich weniger als $50{,}12 + 38{,}26 = 88{,}38$ mg N finden müssen; gefunden wurden 89,6 mg N; demnach scheint eine Veränderung des in dem milchsauren Salz enthaltenen Ammons nicht erfolgt zu sein.

Versuch VI.

Lymphdrüsen.

Je 50 g zerkleinerte Lymphdrüsen werden am 23. XI. angesetzt und zwar:

*) Ascoli, Über die Stellung der Leber im Nucleinstoffwechsel. Pflügers Archiv 72, 340.

**) Chassevant et Richet, Des ferments solubles uropoëtiques du foie. Compt. rend. de la s. b. 40, 743.

***) M. Jacoby, Über die Oxydationsfermente der Leber. Virchows Archiv 157, 235.

†) Wiener, Über Zersetzung und Bildung der Harnsäure im Tierkörper. Archiv f. exp. Path. u. Pharm. 42, 375.

††) Schwarz, Über Bildung von Harnstoff aus Oxaminsäure im Tierkörper. Archiv f. exp. Path. u. Pharm. 41, 67.

a) ohne Zusatz
b) mit 0,7 g Glykokoll + einigen Tropfen Na_2CO_3
c) „ 1,5 „ salzsaurem Glykosamin + einigen Tropfen Na_2CO_3
d) „ 1,0 „ Harnsäure + einigen Tropfen Na_2SO_4
e) „ 0,4 „ Cystin

} + 100 ccm physiolog. Kochsalzlösung + Toluol

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		b) Glykokoll		c) Glykosamin		d) Harnsäure		e) Cystin	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
11 Tage	34,4	48,16	34,6	48,5	39,7	55,6	32,8	45,9	31	43,4

Aus den angegebenen Zahlen geht hervor, daß nur das salzsaure Glykosamin eine Ammoniakabspaltung erfahren hat; dieses Ergebnis ist um so auffallender, als die Lymphdrüsen sonst an Fermenten sehr reiche Organe sind.

Versuch VII.

Nebennieren.

Je 60 g zerkleinerte Nebennieren werden am 24. XII. angesetzt und zwar:

a) ohne Zusatz
b) mit 0,8 g Glykokoll + einigen Tropfen Ca_2CO_3
c) „ 1,5 „ salzsaurem Glykosamin + einigen Tropfen Na_2CO_3
d) „ 1,0 „ Harnsäure + einigen Tropfen Na_2CO_3

} + 100 ccm physiolog. Kochsalzlösung + Toluol

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		b) Glykokoll		c) Glykosamin		d) Harnsäure	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
13 Tage	gefault		25,06	35,08	58,4	81,76	23,04	32,25

Versuch VIII.

Nebennieren.

Am 27. XII. werden 2 Proben angesetzt (je 50 g):

a) ohne Zusatz
b) mit 0,5 Tyrosin
} + 100 ccm physiologischer Kochsalzlösung + Toluol.

Nach 18tägiger Digestion wurden gefunden:

bei a) 29,68 mg N (21,2 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4),

bei b) 33,32 mg N (23,8 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4).

Versuch IX.

Nebennieren.

Je 35 g Nebenniere werden am 15. XII. in den Brutschrank gesetzt und zwar:

a) ohne Zusatz
b) mit 0,4 g Glykokoll
„ 0,9 „ salzsaurem Glykosamin
} + 100 ccm physiolog. Kochsalzlösung + Toluol (mit der Schüttelmaschine 1 Stunde geschüttelt)

Dauer der Digestion	a) Zusatz		b) Glykokoll		c) Glykosamin	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
16 Tage	12,3	17,22	13,4	18,76	16,16	22,62

Übereinstimmend geht aus diesen Versuchen eine umfangreiche Zerlegung des Glykosamins hervor; in Versuch VII sind fast 0,6 g Glykosaminchlorhydrat zersetzt worden; leider war die Normalprobe gefault und so kann die Differenz nur gegen den (NH_3) Stickstoff des Glykokolls gemessen werden, über dessen Spaltung in diesem Versuch ein Urteil nicht möglich ist.

Die Bildung des Suprarenins in der Nebenniere — dessen aromatischer Kern dem Eiweiß oder einem seiner Spaltungsprodukte entstammen muß — ließ einen Versuch mit einer aromatischen Aminosäure wünschenswert erscheinen: Tyrosin wird tatsächlich unter NH_3-Abspaltung zerlegt (Versuch VIII).

Versuch X.

Niere.

Je 50 g Schweinsniere werden am 25. XI. angesetzt und zwar:
a) ohne Zusatz
b) mit 0,7 g Glykokoll
c) „ 1,2 „ salzsaurem Glykosamin
d) „ 1 „ Harnsäure
} + 100 ccm physiolog. Kochsalzlösung + Toluol

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		b) Glykokoll		c) Glykosamin		d) Harnsäure	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
14 Tage	22,66	31,72	21,06	29,48	40,26	56,36	25,06	35,08

Versuch XI.

Niere.

Je 45 g Rindernierenbrei werden am 11. XII. in den Wärmeschrank gestellt und zwar:
a) ohne Zusatz
b) mit 0,7 g Asparagin
} + 100 ccm physiolog. NaCl-Lösung + Toluol (mit der Schüttelmaschine geschüttelt).

Nach vierwöchentlicher Digestion finden sich:

bei a) 21,28 mg N (15,2 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4);

bei b) 86,75 mg N (61,97 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4).

Versuch XII.

Niere.

Je 50 g Rindernierenbrei werden am 4. I. angesetzt und zwar:

a) ohne Zusatz
b) mit 0,3 g Glykokoll
c) „ 0,4 „ salzsaurem Glykosamin (neutralisiert)
d) „ 0,7 „ Harnsäure
e) „ 0,4 „ Acetamid
f) eine Probe wird gekocht und nachher mit 0,5 g Asparagin versetzt

} + 100 ccm physiolog. NaCl-Lösung + Toluol (mit der Schüttelmaschine 2 Stunden geschüttelt)

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		b) Glykokoll		c) Glykosamin	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
14 Tage	17,8	24,94	18,82	26,42	21,84	30,57

Dauer der Degistion	d) Harnsäure		e) Acetamid		f) gekochte Probe + Asparagin	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
14 Tage	18,56	25,98	22,1	30,94	10,54	14,75

Die Durchsicht dieser Versuche läßt wiederum eine merkliche Spaltung des Glykosamins erkennen, — in Versuch X sind fast 0,4 g Glykosaminchlorhydrat zersetzt worden, während Glykokoll fast unverändert bleibt. Das Amid-N des Asparagins wird wie in den Leberversuchen auch hier völlig abgespalten; 0,7 g Asparagin (wasserhaltig berechnet) enthalten 65,3 mg Amid-N — hier sind 65,4 mg abgespalten worden. Gleichzeitig ist aus Versuch XIIf zu ersehen, daß Asparagin durch gekochtes Organ nicht verändert wird. Acetamid erfährt eine unerhebliche Ammoniakabspaltung — die N-Menge von 6 mg entspricht noch nicht 0,03 g Acetamid; auch die Harnsäure gibt etwas Ammoniak ab, dessen Menge namentlich in Versuch X nicht unerheblich ist.

Versuch XIII.

Muskel.

Je 50 g fein zerriebenen Pferdefleisches werden am 4. XII. angesetzt und zwar:

a) ohne Zusatz
b) mit 0,5 g Glykokoll
c) „ 0,5 „ salzsaurem Glykosamin + äquivalenter Menge Na_2CO_3
d) „ 0,7 „ Harnsäure + äquivalenter Menge Na_2CO_3 (zur Bildung von saurem harnsaurem Natrium)

} + 100 ccm physiolog. NaCl-Lösung + Toluol

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		b) Glykokoll		c) Glykosamin		d) Harnsäure	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
13 Tage	13,6	19,12	14,2	19,8	16,4	22,96	14,0	19,6

Auch hier ist eine geringe Desamidierung nicht zu verkennen, sie ist jedoch selbst beim Glykosamin nur unerheblich (0,05 g zersetzt).

Versuch XIV.

Darmschleimhaut.

Der Rinderdarm wird mit Wasser tüchtig ausgewaschen, nachher mit Toluolwasser gereinigt, und die Schleimhaut abgeschabt.

Je 60 g der Schleimhaut werden am 8. XII. in den Brutschrank gestellt.

a) ohne Zusatz
b) mit 0,5 g Glykokoll
c) „ 0,5 „ salzs. Glykosamin + der äquivalenten Menge Na_2CO_3
d) „ 0,7 „ Harnsäure + der äquivalenten Menge Na_2CO_3

} + 100 ccm Wasser + Toluol (zwei Stunden mit der Schüttelmaschine geschüttelt.)

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		b) Glykokoll		c) Glykosamin		d) Harnsäure	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
12 Tage	26,2	36,68	36	50,4	36,6	51,24	39,40	55,16

Versuch XV.

Darmschleimhaut.

60 g der ebenso behandelten Schleimhaut werden mit 0,5 g Asparagin versetzt, eine Probe bleibt ohne Zusatz.

Nach neuntägiger Digestion enthält die Normalprobe 29,96 mg N, die mit Asparagin versetzte 61,6 mg N.

Der letztere Wert stellt nur einen Minimalwert dar, weil bei der Destillation nicht genügend Säure vorgelegt war und daher NH_3 verloren ging, immerhin wurden auch so noch 31,7 N(NH_3) gefunden, welche etwa 0,35 g zersetzten Asparagins entsprechen.

Versuch XVI.

Darmschleimhaut.

Je 100 g Darmschleimhaut werden am 23. XII. angesetzt und zwar

a) ohne Zusatz
b) mit 0,2 g Glykokoll
c) „ 0,5 „ salzs. Glykosamin (dem die äquivalente Menge Na_2CO_3 erst nach 14tägiger Digestion zugesetzt wurde).
d) „ 0,9 „ asparaginsaures Natron.

} + 50 ccm physiol. NaCl-Lösung + Toluol (durch 3 Stunden geschüttelt).

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		b) Glykokoll		c) Glykosamin		d) Asparaginsäure	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
26 Tage	33,2	46,48	31,12	43,56	62,34	87,27	34,26	47,96

In Versuch XIV ist bei allen zugesetzten Substanzen eine recht beträchtliche Ammoniakabspaltung zu erkennen, besonders hoch ist dieselbe für Harnsäure. In auffallendem Gegensatze dazu stehen die Ergebnisse des Versuches XVI; die NH_3-Stickstoffzahl für Glykokoll ist niedriger als die Normalzahl, während die Vermehrung des NH_3-Stickstoffs bei Glykosamin größer ist, als dem Stickstoff der zugesetzten Glykosaminmenge entspricht. Da in diesem Versuche eine größere Menge (100 g) von Schleimhaut verwendet wurde, der Wasser in verschiedener Menge anhaften kann, so ist es nicht unwahrscheinlich, daß trotz genauer Wägung, in den verschiedenen Proben ungleiche Substanzmengen vorhanden waren; deshalb soll von einer Verwertung dieses Versuches abgesehen werden.

Die Bedeutung dieses Desamidierungsvermögens des Darmes für den intermediären Stoffwechsel und für den weiteren Abbau der durch die Drüsenfermente erzielten Spaltungsprodukte des Eiweißes läßt sich zurzeit nicht übersehen. Wenn man bedenkt, daß das gesamte Blut des Verdauungsapparates der Leber zugeführt wird, so liegt die Vorstellung sehr nahe, daß dem Darme eine vorbereitende Aufgabe für die Harnstoffbildung — eine, wenn auch nicht in größtem Umfange erfolgende, Ammoniakabspaltung aus stickstoffhaltigem Material überhaupt — zufallen dürfte. Damit stünde in guter Übereinstimmung, daß nach Nencki*) und Zaleski das Blut der Pfortader 3 bis 4 mal mehr NH_3 enthält als das arterielle Blut, ja daß man besonders bei Fleischnahrung in den Ästen der Pfortader einen noch höheren Gehalt an Ammoniak antrifft als im Pfortaderblute selbst.

Versuch XVII.

Milz.

Je 50 g fein zerkleinerter Milz werden am 10. XII. angesetzt und zwar:

a) ohne Zusatz
b) mit 0,2 g Glykokoll
c) „ 0,4 „ Glykosaminchlorhydrat
d) „ 0,5 „ Asparagin
e) „ 0,5 „ Harnsäure

} + 100 ccm physiolog. NaCl-Lösung + Toluol (mit der Schüttelmaschine geschüttelt)

*) Nencki, Pawlow und Zaleski, Über den Ammoniakgehalt des Blutes usw. Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 37, 26. — Horodyński, S. Salaskin und J. Zaleski, Zeitschr. f. physiol. Chemie 35, 251.

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		b) Glykokoll		c) Glykosamin		d) Asparagin		e) Harnsäure	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
11 Tage	35,0	49,0	35,0	49,0	40,6	56,84	69,2	96,88	36,4	50,96

Milzgewebe spaltet Glykosamin in demselben Umfange als die anderen Organe — es sind etwa 0,12 g Glykosaminchlorhydrat zerlegt worden. Glykokoll scheint nicht angegriffen zu werden, während Harnsäure eine deutliche Ammoniakabspaltung aufweist. Der Amidstickstoff des Asparagins ist auch von der Milz ganz abgespalten [0,5 g zugesetzten Asparagins enthalten 46,6 mg N (NH_3), wiedergefunden wurden 96,88 — 49 = 47,8 mg N].

Versuch XVIII.

Hoden.

Je 50 g zerriebener Stierhoden werden am 15. XII. in den Brutschrank gegeben und zwar:

a) 2 Proben ohne Zusatz
b) 1 Probe mit 0,4 g Glykokoll
c) 1 „ „ 0,95 g Asparagin
d) 1 „ „ 0,7 g Glykosaminchlorhydrat
e) 1 „ wurde gekocht und dann mit 0,5 g Glykosaminchlorhydrat versetzt

} + 100 ccm physiolog. NaCl-Lösung + Toluol (mit der Schüttelmaschine geschüttelt).

A.

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		c) Asparagin		e) gekochte Probe + Glykosamin	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
14 Tage	17,6	24,64	82,8	115,92	7,2	10,08

B.

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		b) Glykokoll		d) Glykosamin	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
20 Tage	18,6	26,04	19,6	27,44	24,8	34,72

Hoden erwies sich also bei fast allen zugesetzten Verbindungen als recht wirksam. 0,95 g Asparagin enthalten 88,63 mg Amid-N; abgespalten wurden 115,92 — 24,04 = 91,88 mg N. Von Glykosaminchlorhydrat wurden ungefähr 0,13 g unter Ammoniakbildung

zerlegt; gleichzeitig zeigt Versuch A e, daß die Ammoniakabspaltung aus Glykosamin im gekochten Organe nicht erfolgt. Nur beim Glykokoll ist die Spaltung recht gering.

Versuch XIX.

Pankreas.

Je 60 g Rinderpankreasbrei werden am 18. I. angesetzt und zwar:

a) 2 Proben ohne Zusatz
b) 1 Probe mit 0,3 g Glykokoll
c) 1 „ „ 0,6 „ salzsaurem Glykosamin — neutralisiert
d) 1 „ „ 0,5 „ Tyrosin
e) 1 „ „ 0,5 „ Harnstoff
f) 1 „ „ 0,5 „ Harnsäure + einigen Tropfen Na_2CO_3
g 1 „ „ 0,4 „ Acetamid

} + 100 ccm physiolog. NaCl-Lösung + Toluol (durch 2 Stunden mit der Schüttelmaschine geschüttelt).

A.

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		c) Glykosamin		e) Harnstoff		f) Harnsäure	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
7 Tage	48,9	68,46	48,57	67,99	65,04	91,05	48,8	68,32

B.

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		b) Glykokoll		d) Tyrosin		g) Acetamid	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
10 Tage	52,82	73,94	61,2	85,68	54,1	75,74	53,2	74,48

C.

50 g Pankreasbrei werden am 1. II. angesetzt und zwar

a) eine Probe ohne Zusatz
b) „ „ mit 0,5 g Harnstoff
c) „ „ „ 0,25 g Acetamid

} + 100 ccm physiol. Kochsalzlösung + Toluol (durch 2½ Stunden mit der Schüttelmaschine geschüttelt).

Dauer der Digestion	a) ohne Zusatz		b) Harnstoff		c) Acetamid	
	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N	ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4	mg N
7 Tage	53,32	74,64	59,46	83,44	52,0	72,80

Das Ergebnis dieser Versuche ist in verschiedener Richtung bemerkenswert. Von allen untersuchten Organen ist das Pankreas das einzige, das keine Spaltung des Glykosamins erkennen läßt; auch aus Tyrosin, Acetamid, Harnsäure spaltet es kein Ammoniak ab. Um so auffallender ist die reichliche Abspaltung von Ammoniak aus Glykokoll — es ist fast 0,1 g zersetzt worden, eine Menge, die sonst keines der untersuchten Organe zu zerlegen vermochte —, namentlich aber die überraschend große Desamidierung des Harnstoffs. Es besteht hier ein augenfälliger Gegensatz zum Verhalten der Leber. Dort Spaltung des Glykosamins und Acetamids, unerhebliche Spaltung des Harnstoffs und Glykokolls, hier sehr erhebliche Spaltung des Harnstoffs und Glykokolls, keine Spaltung von Glykosamin und Acetamid. Bei der Beurteilung dieser Verschiedenheiten wird man wohl zunächst an die Beteiligung einer Trypsinwirkung im Pankreas denken müssen. Schwarzschild*) hat zwar nachgewiesen, daß weder Harnstoff noch Acetamid von Trypsin angegriffen wird, streng genommen kann dieser Nachweis aber nur für das von Schwarzschild verwendete Trypsin gelten. Nun ist aber aus verschiedenen, anderswo und im hiesigen Institute gefundenen Tatsachen zu entnehmen, daß im Pankreasbrei verschiedene tryptische Fermente nebeneinander vorhanden sind, von denen das von Biuretreaktion freie Trypsin Schwarzschilds wahrscheinlich nur einen Teil darstellt. Daher will ich die Möglichkeit einer Mitwirkung des „Trypsins“ in meinen Pankreasversuchen nicht ganz von der Hand weisen.

III.

Die Erwägung, daß die Sättigung der Organgemische mit Toluol den Ablauf des Desamidierungsvorganges — sei derselbe nun rein fermentativer Art oder an die Mitwirkung der Zelle geknüpft — wesentlich verzögern könne, machte Versuche an überlebenden Organen wünschenswert. Das für solche Zwecke besonders geeignete Durchblutungsverfahren war hier ausgeschlossen, weil das einmal abgespaltene Ammoniak hierbei zu rasch weiter verändert und außerdem in den Organen zurückgehalten werden kann. Die Versuche wurden daher in der Weise angestellt, daß durch Verblutung eben getöteten Tieren sofort die Leber entnommen, zerkleinert, mit dem defibrinierten Blute und dem betreffenden Zusatze versetzt, auf der Schüttelmaschine 1 bis 2 Stunden lang bei 40° kräftig mit Luft geschüttelt und dann verarbeitet, oder — wenn die Verarbeitung nicht gleich möglich

*) M. Schwarzschild, Über die Wirkungsweise des Trypsins. Diese Beiträge 4, 155.

war — durch Schütteln mit Toluol vor weiterer Zersetzung geschützt wurde.

Versuch XX.

Ein Hund wird durch Verbluten getötet, das aus der Karotis fließende Blut sofort defibriniert, die Bauchhöhle eröffnet und die Leber herausgenommen, fein zerhackt und zermalmt. Je 60 g derselben werden mit 100 ccm Blut in gut verschließbare Glasbüchsen abgewogen; eine Probe bleibt ohne Zusatz, eine Probe wird mit 0,4 g Glykokoll und eine mit 0,5 g neutralisiertem salzsaurem Glykosamin versetzt. Sämtliche Proben werden nun auf der Schüttelmaschine durch 1 1/2 Stunden bei 40° C geschüttelt.

Die Ammoniakbestimmung wurde in der anfangs geschilderten Weise auch hier vorgenommen, nur wurde eine große Menge Tanninlösung (100 ccm) zur Fällung benutzt und das Gesamtvolumen auf 500 gebracht. Auf möglichst gleichartige Behandlung der Proben wurde hier, wie auch sonst, besonders Gewicht gelegt.

Das Ergebnis war folgendes:

die Normalprobe verunglückte;
die mit Glykokoll versetzte Probe ergab 15,05 mg N (NH_3);
die mit Glykosamin „ „ „ 21,70 mg N (NH_3).

Mangels der Normalzahl kann über eine etwaige Ammoniakabspaltung aus Glykokoll nichts ausgesagt werden; dieselbe wird allerdings durch die Normalzahlen der späteren Versuche sehr wahrscheinlich. Hingegen ist die Desamidierung des Glykosamins unverkennbar, und zwar ist der erhaltene Wert — die Differenz gegen den abgespaltenen NH_3-Stickstoff des Glykokolls — ein Minimalwert und entspricht fast genau 0,1 g zersetzten salzsauren Glykosamins. Bei der kurzen Dauer des Versuches ist eine Bakterienmitwirkung mit Sicherheit auszuschließen; der Versuch wurde nicht streng aseptisch, jedoch mit größter Sauberkeit und möglichster Beschleunigung durchgeführt.

Versuch XXI.

Um den Einfluß von Bakterien mit aller Sicherheit zu vermeiden, wurde dieser Versuch aseptisch durchgeführt. Alle Gefäße, Instrumente, Zerkleinerungsmaschine u. s. w. waren sterilisiert.

Ein Hund wird wie in Versuch XX getötet.

Zu je 27 g zerkleinerter Leber werden 50 ccm defibrinierten Blutes gesetzt und 2 Reihen von Proben angesetzt:

I.	II.
a) ohne Zusatz;	a) ohne Zusatz;
b) mit 0,4 g Glykokoll;	b) mit 0,4 g Glykokoll;
c) mit 0,5 g Asparagin;	c) mit 0,5 g neutralisiertem salzsaurem Glykosamin.

Alle 6 Proben werden auf der Schüttelmaschine bei 37° geschüttelt und zwar die Proben I 1 1/2 Stunden, Proben II 2 1/2 Stunden. Da alle Proben an einem Tage nicht verarbeitet werden konnten, wurden die Proben II nach Ablauf von 2 1/2 stündigem Schütteln bei 37° mit Toluol versetzt und

nun noch einmal durch 2 Stunden geschüttelt, dann am nächsten Tage verarbeitet.

Proben I.

Es wurden gefunden:

bei a) 3,92 mg N (2,8 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4);

bei b) (Glykokoll) 15,12 mg N (10,8 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4);

bei c) (Asparagin) 20,2 mg N (14,43 ccm $\frac{n}{10}$-HS_2O_4).

Proben II.

Es wurden gefunden:

bei a) 5,68 mg N (4,06 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4);

bei b) (Glykokoll) 15,51 mg N (11,08 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4);

bei c) (Glykosamin) 7,0 mg N (5,0 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4).

Es geht also aus diesen Versuchen eine erhebliche Ammoniakabspaltung aus Glykokoll hervor, die in einer Stunde größer ist als in den antiseptischen Versuchen nach vielen Tagen; wie zu erwarten war, ist auch ein beträchtlicher Teil des Amid-N vom Asparagin abgespalten worden. Hingegen ist in diesem Versuche die Zerlegung des Glykosamins — wenn auch deutlich erkennbar — doch wesentlich kleiner als in Versuch XX; eine Ursache hierfür weiß ich nicht anzugeben.

Versuch XXII.

Aseptischer Versuch wie Versuch XXI.

Je 50 g Leber werden mit 50 ccm Blut versetzt und außerdem
- a) mit 0,4 g Tyrosin,
- b) „ 0,5 g neutralisiertem salzsaurem Glykosamin,
- c) ebenfalls mit 0,5 g neutralisiertem salzsaurem Glykosamin,
- d) eine Probe bleibt ohne Zusatz.

Alle Proben werden durch $1\frac{3}{4}$ Stunden bei 37° geschüttelt.
Es wurden gefunden in der Probe

ohne Zusatz 5,96 mg N (4,26 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4)

mit Tyrosin 7,44 mg N (5,3 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4)

I. mit Glykosamin 8,20 mg N (5,86 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4)

II. „ „ 8,33 mg N (5,95 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4).

Tyrosin wurde also in Übereinstimmung mit früheren Versuchen nur sehr wenig gespalten, auch beim Glykosamin schien die Spaltung nur sehr langsam zu erfolgen.

IV.

Vergleicht man die desamidierende Wirkung der einzelnen Organe gegenüber den einzelnen stickstoffhaltigen Substanzen, so ergibt sich folgendes:

a) Glykokoll.

In den antiseptischen Versuchen ist die ammoniakabspaltende Wirkung gegenüber Glykokoll nicht konstatiert bei Milz und Lymphdrüsen, in mäßigem Umfange bei Niere, Leber, Nebenniere und Hoden, in erheblicher Weise bei Darm und Pankreas, die durchschnittlich dreimal soviel Ammoniak abspalten als die Leber. In jenen Leberversuchen, die serienweise untersucht wurden, zeigt sich beim Glykokoll (auch bei Glykosamin) ein auffallendes Verhalten; bei der erstuntersuchten Probe ist eine deutliche Ammoniakzunahme wahrzunehmen, die bei den später untersuchten Proben derselben Serie wieder verschwindet (Versuch II A und B, Versuch III A, B, C), d. h. nicht in gleichem Sinne mit dem autolytisch abgespaltenen Stickstoff zunimmt. Die Unterschiede sind größer, als daß sie innerhalb der Fehlergrenzen fallen könnten. Denn daß die Abspaltung des Stickstoffs bei der Autolyse unter sorgfältig gleich eingehaltenen Bedingungen sehr gleichmäßig verläuft, zeigt Versuch III Da, in welchem zwei Leberproben, welche vier Wochen digeriert und gleichzeitig verarbeitet wurden, genaue Übereinstimmung des abgespaltenen Stickstoffs ergeben. Die naheliegende Vermutung, daß ein Teil des abgespaltenen Ammoniaks auch in der autolysierten Leber zur Harnstoffbildung verwendet wird, scheint schon darum nicht zuzutreffen, weil in diesem Falle der autolytisch abgespaltene Stickstoff großen Schwankungen unterliegen müßte — was nicht der Fall ist. Eine ausreichende Erklärung für dieses Verhalten kann ich nicht geben.

Wie aus den Versuchen mit dem frischen Organ hervorgeht, ist die spaltende Wirkung der Leber für Glykokoll durchaus nicht gering: innerhalb kurzer Zeit (1 bis 2 Stunden) wird soviel Ammoniak abgespalten, wie z. B. vom lebhaft spaltenden Darm im antiseptischen Versuch nach 12 Tagen. So darf wohl gefolgert werden, daß die Desamidierung des Glykokolls im Tierkörper sich sehr leicht vollzieht. Diese Annahme steht in guter Übereinstimmung mit den Versuchen Stoltes, der eine rapide Umwandlung selbst großer Dosen intravenös injizierten Glykokolls zu Harnstoff konstatieren konnte, sowie mit denen Abderhalden*) und Bergells, die nach interner wie subkutaner Einverleibung von Glykokoll bei Kaninchen aus dem Harne kein Glykokoll isolieren konnten.

b) Tyrosin.

Soweit aus meinen Versuchen zu ersehen, scheint Tyrosin in der Leber nur schwer angegriffen zu werden, in der Nebenniere findet eine Spaltung statt.

*) Abderhalden und Bergell, Der Abbau der Peptide im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chemie 39, 9.

c) Phenylalanin.

Wurde in der Leber nicht gespalten. Interessanter Weise konnte auch Stolte beobachten, daß die aromatischen Monaminosäuren bei intravenöser Einführung eine Harnstoffvermehrung nicht veranlassen.

d) Leucin.

Wurde in der Leber erheblich gespalten.

e) Cystin.

Wird in den Lymphdrüsen nicht gespalten; in der Leber wurde einmal eine Ammoniakabspaltung beobachtet.

f) Asparagin und Glutamin.

Diese Amide wurden in allen Organen, denen sie zugesetzt wurden, desamidiert, und zwar wurde der gesamte Amidstickstoff abgespalten. Die Spaltung der Amide von Aminosäuren vollzieht der Organismus offenbar mit der größten Leichtigkeit.

g) Acetamid.

Die Versuche mit Acetamid wurden zum Vergleiche mit den Amiden der Aminosäuren ausgeführt. Es zeigte sich, daß Acetamid durch Niere und Leber in größerem Umfange, weniger durch Pankreas zerlegt wird; doch bleibt diese Ammoniakabspaltung weit hinter der des Asparagins zurück, sie beträgt im besten Falle (Leber) ungefähr 10 Proz. des Amidstickstoffs. Der Grund hierfür kann im chemischen Bau gelegen sein; die Bindung des NH_2 an die $CH_3.CO$-Gruppe scheint einer völligen Desamidierung minder günstig zu sein, als jene an die $\begin{array}{l} COOH \\ \dot{C}H.NH_2 \\ \dot{C}H_2 \\ \dot{C}O \end{array}$-Gruppe, vermutlich, weil die bereits vorhandene Aminogruppe den sauren Charakter des Komplexes abschwächt.

h) Harnstoff.

Auch der Harnstoff erfährt in der Leber eine geringe Ammoniakabspaltung, eine erheblichere im Pankreas. Ob diese Spaltung für die Zwecke des Stoffwechsels von irgend einer Bedeutung ist, ist nicht zu entscheiden, — wenn auch recht unwahrscheinlich. Die große Diffusibilität einmal gebildeten Harnstoffs entzieht denselben wohl sogleich der Einwirkung von Organfermenten durch Überführung in die Blutbahn.

i) Glykosamin.

Da das Glykosamin als Kohlehydratkomplex vieler Eiweißkörper erkannt und seine Zugehörigkeit zur d-Glykose von

E. Fischer erwiesen ist, haben Untersuchungen über das Verhalten seiner Aminogruppe besonderes Interesse.

Wie aus den Versuchen ersichtlich, steht deren Ergebnis in einem gewissen Gegensatze zu dem bisher bekannten Verhalten des Glykosamins. In Tierversuchen hat sich das Glykosaminchlorhydrat als recht schwer angreifbar erwiesen. Fabian*) fand bei Kaninchen keine Glykogenvermehrung in der Leber nach Fütterung mit salzsaurem Glykosamin; das in größeren Mengen per os gereichte Hydrochlorat wurde zum großen Teile (18 Proz.) unverändert ausgeschieden, zum Teil sogar im Darminhalte unverändert wiedergefunden. Dasselbe Ergebnis hatten Versuche von Offer und Fränkel**) an Hunden, die ungefähr 20 Proz. des stomachal verabreichten und 26 Proz. subkutan eingeführten Glykosaminchlorhydrats im Harne wiederfanden.

In meinen Versuchen erwies sich der Ammoniakrest des Glykosamins für alle untersuchten Organe mehr oder weniger angreifbar, mit Ausnahme des Pankreas. Am stärksten waren Nebenniere und Niere wirksam, eine Mittelstellung nahmen Leber, Darm, Hoden und Milz ein, am wenigsten wirksam war Muskel. Die zersetzten Glykosaminmengen schwanken für die angewandte Organmenge von 0,05 bis 0,4 g und scheinen von der Größe des Glykosaminzusatzes in weiten Grenzen unabhängig zu sein. Kontrollversuche, in denen 0,5 g salzsaures Glykosamin mit Soda alkalisch gemacht, mit Toluol geschüttelt und verschieden lange Zeit bei 37° gehalten wurden, ergaben eine geringe, langsame Ammoniakabspaltung; so wurden nach 24 Stunden 0,0004 g N und nach 10 Tagen 0,007 g N (in Form von NH_3) gefunden. Deshalb wurden die Versuche in der Weise variiert, daß bald natives salzsaures Glykosamin (Versuch I, II, VAc, IX, X, XVII, XVIII), bald neutralisiertes (Versuch IIIC, VII, XIV) als Zusatz in Verwendung kam, einmal wurde die äquivalente Menge Soda erst im Verlaufe der Digestion hinzugefügt (Versuch IIID) — ohne daß ein merklicher Einfluß auf die Größe der Ammoniakabspaltung zutage trat.

Einem möglichen Einwand soll gleich hier begegnet werden. Arnheim***) hat jüngst eine Beschleunigung der Autolyse durch Traubenzucker beobachtet; trotzdem eine Bestätigung dieser Beobachtung noch abzuwarten bleibt, könnte man die Ammoniak-

*) Fabian, Über das Verhalten des salzsauren Glykosamins im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie 27, 167.

**) Offer und Fränkel, Über das Verhalten des salzsauren Chitosamins im Tierkörper. Centralbl. f. Physiologie 13, 489.

***) Arnheim, Zeitschr. f. physiol. Chemie 40.

vermehrung nach Glykosaminzusatz bei dem ähnlichen chemischen Baue beider Körper auf die gleiche Ursache zurückführen. Demgegenüber ist hervorzuheben, daß die Ammoniakabspaltung aus Glykosamin unter den verschiedensten Verhältnissen erzielt wurde, namentlich aber auch mit frischen Organen. (Versuch XX, XXI.)

Versuche, welche darauf abzielten, die Umwandlungsprodukte des Glykosamins zu isolieren, führten offenbar wegen der zu geringen Mengen vorläufig zu keinem schlagenden Resultate.

Zu diesem Zwecke waren größere Mengen von Niere und Nebenniere mit genau gewogenen Glykosaminmengen versetzt und durch längere Zeit (3 bis 5 Wochen) der Autolyse überlassen worden. Der Organbrei wurde dann unter Zusatz von Essigsäure koaguliert, der Eiweißniederschlag mit heißem Wasser gewaschen und das Filtrat samt Waschwasser auf ein bestimmtes Volumen gebracht. In dieser Flüssigkeit wurde die Menge des Glykosamins nach Knapp titriert; auf diese Weise wurde meist eine Differenz von 0,3 bis 0,5 g Glykosamin gegen die zugesetzte Menge gefunden. Die Flüssigkeit wurde dann eingedampft und in verschiedener Weise weiter behandelt. Traubenzucker konnte nie mit Sicherheit nachgewiesen werden; doch ist damit die Möglichkeit seiner Entstehung nicht auszuschließen, weil er im Verlaufe der Autolyse zerstört worden sein könnte.

So verlockend es wäre, die Ammoniakabspaltung aus Glykosamin für physiologische und pathologische Gesichtspunkte zu verwerten, muß die Unsicherheit unserer Kenntnisse über die Quellen der Kohlehydrate im Organismus und die Art ihrer Bildung zu größter Vorsicht mahnen. Zunächst bleibt noch zu untersuchen, in welchem Umfange diese Spaltung des Glykosamins im lebenden Organismus erfolgt. Doch muß wohl in diesem Vorgange einer der Wege gesehen werden, auf dem die Eiweißkörper ihre Kohlehydratgruppen dem Stoffwechsel zur Verfügung stellen können. Und gerade von diesem Gesichtspunkte aus fügen sich meine Erfahrungen in den Rahmen der über das Glykosamin bekannten Tatsachen. Das Spaltungsvermögen der Organe für Glykosamin scheint ein eng begrenztes zu sein (vgl. Versuch XXI, XXII). Ist einmal das Desamidierungsvermögen für die Spaltung des Eiweiß-Glykosamins vollauf in Anspruch genommen, so kommt bei weiterer Zufuhr von Glykosamin der Überschuß glatt zur Ausscheidung. Das nach und nach in kleinen Mengen aus dem Eiweiß abgespaltene Glykosamin vermag eben der Organismus zu verwerten, während größere auf einmal ins Blut eintretende Quantitäten der Desamidierung entgehen. Seine „Assimilationsgrenze“ ist besonders niedrig.

k) Harnsäure.

Harnsäure wurde unter Ammoniakbildung zersetzt durch Leber (Versuch IIB, IIIB), Niere (Versuch X, XIId), Darm (Versuch XIV), Milz (Versuch XVII) und sehr wenig durch Muskel.

Das Auftreten von Ammoniak als Zersetzungsprodukt der Harnsäure ist bisher nicht beobachtet worden. Wiener*) konnte in der Rinderniere Glykokoll als Zersetzungsprodukt nachweisen und schließt daraus, daß von allen bekannten Zersetzungen der Harnsäure extra corpus nur die von Strecker**) gefundene — in Glykokoll, Kohlensäure und Ammoniak — für den Tierkörper Wahrscheinlichkeit besitzt. Diese Annahme erhält durch meinen Befund von Ammoniak als Spaltungsprodukt der Harnsäure eine Stütze, wenngleich die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden kann, daß das in meinen Versuchen gefundene Ammoniak dem zunächst gebildeten, dann aber wieder zersetzten Glykokoll entstammt.

V.

Durch die vorliegenden Untersuchungen ist die weite Verbreitung eines desamidierenden Vorganges, vermutlich fermentativer Natur, im Organismus erwiesen. Über die quantitative Wirkungsgröße desselben gestatten diese Versuche jedoch keinen bindenden Schluß. Wie gezeigt wurde, wird das Desamidierungsvermögen durch Antiseptika beträchtlich geschwächt, und nur der Vergleich aseptisch und antiseptisch durchgeführter Versuchsreihen berechtigt zu der Vorstellung, daß sich dieser Prozeß in einem für den intermediären Stoffwechsel bedeutungsvollen Umfange vollzieht. Seine Bedeutung ist wohl nicht allein in der Vorbereitung stickstoffhaltigen Materials für die Harnstoffbildung zu suchen. Die stickstofffrei gewordenen Komplexe brauchen nämlich keineswegs, wie man meist annimmt, sofort der Oxydation zu Kohlensäure und Wasser zu unterliegen, sondern können auch zum Aufbau stickstofffreier Stoffe (Kohlehydrat und Fett) Verwendung finden, und so dürfte die Desamidierung möglicherweise auch als der erste Schritt bei dem Aufbaue stickstofffreier Stoffe aus zerfallendem Eiweiß Beachtung verdienen.

*) H. Wiener, Über Zersetzung und Bildung der Harnsäure im Tierkörper. Archiv f. exp. Pathologie und Pharmakologie **42**, 375.

) Strecker, Bildung von Glykokoll aus Harnsäure. Annalen der Chemie und Pharmacie **108, 141.

XX.

Zur Kenntnis des Roggen-Pollens und des darin enthaltenen Heufiebergiftes.

Von Dr. **Kammann**, Assistenten am Instistut.

Aus dem staatlichen hygienischen Institut zu Hamburg. Direktor: Prof. Dr. Dunbar.

In seiner Arbeit „Zur Ursache und spezifischen Heilung des Heufiebers“ führte Dunbar den Nachweis, daß das Heufieber durch Pollen von Pflanzen, insbesondere von Gräsern veranlaßt wird, daß aber der in den Vereinigten Staaten von Nordamerika beobachtete Herbstkatarrh insofern eine Sonderstellung einnimmt, als er durch Pollen von Solidago, von Ambrosiaceen und anderen spät blühenden Pflanzen bedingt ist.

Im Anschluß an diese Darlegungen trat Dunbar naturgemäß sogleich der Frage näher, welcher chemische Körper den wirksamen Bestandteil der Pollenkörper ausmache. Auf Grund der ersten Laboratoriumsversuche war er geneigt, die Stärkestäbchen als das krankmachende Agens anzusprechen; durch fortgesetzte Versuche aber gelang es ihm, den Beweis zu führen, daß die eigentliche Giftwirkung einem eiweißartigen Körper zur Last zu legen ist. Derselbe ließ sich durch dünne Kochsalzlösung aus den Pollenkörnern ausziehen und durch Alkohol wiederum fällen. Nach diesen Feststellungen ist nunmehr die Frage zu erörtern, in welchem Prozentverhältnis jener giftige Körper zu den anderen Pollenbestandteilen steht und wie er sich näher charakterisieren läßt. Es soll dies die Aufgabe der vorliegenden Arbeit sein.

Zunächst beschäftigen wir uns mit dem Roggenpollen, weil dieser vor allem neben dem nahe verwandten Weizenpollen die Veranlassung zu dem in Deutschland beobachteten Heufieber ist, während die Pollen anderer Gräser mit Rücksicht auf die geringere Verbreitung der bezüglichen Pflanzen erst an zweiter Stelle interessieren. Von Wert dürfte es vielleicht noch sein, später



einmal die Erreger des Herbstkatarrhs genauer zu analysieren, um festzustellen, in wie weit sich die ätiologische Sonderstellung des Pollens von Solidago und anderen in Betracht kommenden Pflanzen mit ihrem Chemismus begründen läßt.

Der Roggenpollen stellt im lufttrockenen Zustande ein gelbliches, feinkörniges Pulver dar, das einen eigentümlichen Geruch besitzt, der an den frisch gequollener Gerstenkörner erinnert. Die Größe bzw. das Gewicht der Pollenkörner ist von verschwindender Kleinheit; gehen doch etwa 20 Millionen Pollenkörner auf 1 g, welches bei ganz lockerer Schichtung etwa 2 ccm Raum einnimmt. Die Analyse des lufttrockenen Pollens ergibt:

10,18 Proz. Wasser,
86,4 „ organische Substanz,
3,4 „ Asche.

Die Asche setzt sich zusammen aus wenig Kalium, viel Natrium, etwas Eisen und Spuren von Magnesium und Calcium. Von Säuren finden sich Schwefelsäure, Chlorwasserstoffsäure, sowie Phosphor- und Kieselsäure.

Schreiten wir bei der Betrachtung der organischen Substanzen von den weniger wichtigen Bestandteilen zu den vor allem in Betracht kommenden Eiweißstoffen fort, so kommen zunächst die alkohol- bzw. ätherlöslichen Substanzen in Betracht. Diese stellen 3 Proz. der organischen Substanz dar und werden von Fetten und ölartigen Körpern repräsentiert, welche sowohl in der Exine, der äußeren Haut, als auch im Polleninhalt zu suchen sind. Der Rest der organischen Substanz besteht aus:

1. Enzymen und zwar proteolytischen wie diastatischen und zuckerspaltenden,
2. Kohlehydraten,
3. stickstoffhaltigen Substanzen nicht eiweißartiger Natur,
4. Eiweißkörpern.

Die Enzymwirkungen sind sehr schön nachzuweisen, wenn man den Pollen mit dünner Kochsalzlösung extrahiert, die Lösung durch Berkefeldfilter filtriert und das so erhaltene sterile Filtrat auf Fibrinflöckchen, auf eine Gelatinefläche oder verkleisterte, zuckerfreie Stärke einwirken läßt. Das Fibrinflöckchen ist sehr bald verdaut, die Gelatine zeigt einen Verflüssigungstrichter und die Stärkelösung gibt nunmehr eine schöne Reduktion der Fehlingschen Lösung.

Auf die Wirkung des zuletzt genannten saccharifizierenden Enzymes ist vielleicht das oft beobachtete Verschwinden der Stärkestäbchen aus dem Pollen zurückzuführen. Hält man

nämlich Pollenkörner in der feuchten Kammer einige Zeit bei 37° und versucht jetzt mit Lugolscher Lösung zu färben, so erzielt man nicht mehr jene schöne blaue Färbung der Stärke, wie sie die Kontrollprobe ergibt, sondern höchstens einen rötlichen Farbenton. In manchen Fällen ist auch nicht eine Spur von Färbung mehr nachzuweisen, als Beweis dafür, daß sämtliche Stärke verzuckert ist.

Bezüglich der Kohlehydrate können wir uns kurz fassen. Sie machen 25 Proz. der organischen Substanz des Pollens aus und bestehen vorwiegend aus Stärke. Nebenbei finden sich in geringer Menge Kohlehydrate, welche mit Phenylhydrazin und Natriumacetat in essigsaurer Lösung Osazone bilden. Ein Teil derselben charakterisiert sich durch die Orcinreaktion als Pentose.

Wir wenden uns nunmehr zur stickstoffhaltigen organischen Substanz, welche 58 Proz. der gesamten organischen Pollenmaterie ausmacht. Wie schon Dunbar gefunden hat, lassen sich die Eiweißkörper und mit ihnen der wirksame Bestandteil des Pollentoxins durch Kochsalzlösung aus dem Pollen extrahieren. Im Anschluß hieran haben wir noch eine große Reihe von Versuchen bezüglich anderer Extraktionsmittel gemacht, sind aber immer wieder auf die Kochsalzlösung als das geeignetste Extraktionsmittel zurückgekommen. Es kam nur noch darauf an, festzustellen, unter welchen Bedingungen man bezüglich Konzentration, Temperatur und Dauer der Einwirkung die günstigste Ausbeute erzielt.

Die bezüglichen Resultate können wir unter Weglassung der Versuchsprotokolle dahin zusammenfassen, daß eine 5proz. Kochsalzlösung, welche bei 37° 10 Stunden lang einwirkt, allen Anforderungen entspricht.

Wir entziehen dem Pollen auf diese Weise sämtliche Eiweißkörper. Die noch im Rückstand verbleibenden stickstoffhaltigen Substanzen bestehen, wie aus der Brombehandlung hervorgeht, vorwiegend aus ungesättigten Verbindungen, welche schön kristallisieren.

Die Analyse der 86,4 Proz. betragenden organischen Substanz stellt sich, den bisherigen Darlegungen entsprechend, demnach wie folgt:

1. äther- und alkohollösliche Substanzen 3 Proz.,
2. Kohlehydrate 25 Proz.,
3. stickstoffhaltige Körper, nicht eiweißartiger Natur, 18 Proz.,
4. Eiweißkörper 40 Proz.

Fällt man das Kochsalzextrakt mit Alkohol, so erhält man ein weißes, feinkörniges Pulver und das Filtrat ergibt, wenn man

die achtfache Menge absoluten Alkohols angewandt hat, eine vollkommene Ausfällung, indem der Rückstand des eingedampften Filtrats keinerlei Eiweißreaktion mehr gibt. Nunmehr kam es darauf an, festzustellen, ob das auf diese Weise dargestellte Eiweiß ein einheitlicher reiner Körper oder ein Gemenge verschiedener Eiweißsubstanzen sei.

Zu diesem Zwecke wurden 0,5 g der alkoholgefällten Eiweißsubstanzen, die wir nunmehr kurzweg als Protein bezeichnen, mit 20 ccm 2,5proz. Kochsalzlösung behandelt. Es hinterblieb ein beträchtlicher Rückstand. Derselbe wurde abzentrifugiert und die überstehende klare Flüssigkeit mit dem 5fachen Volumen gesättigter Magnesiumsulfatlösung versetzt. Der jetzt entstehende Niederschlag wurde nach 24stündigem Stehen abfiltriert, mit heißem Wasser zur Entfernung des Magnesiumsulfats gewaschen und getrocknet. Er wog 0,21 g. Erhitzte man das Filtrat hiervon, so schied sich weiteres Eiweiß ab, und zwar 0,082 g. Auf diese Weise haben wir die aus dem Pollen mit Kochsalz extrahierbaren, durch Alkohol fällbaren Substanzen in drei Gruppen geschieden und zwar:

1. solche Eiweißkörper, welche sich nach der Alkoholfällung nicht mehr in Kochsalzlösung auflösen (0,20 g von $^1/_2$ g Protein),

2. solche Eiweißkörper, welche sich wieder in Kochsalz lösen und aus der Lösung durch Magnesiumsulfat fällbar sind (0,21 g aus $^1/_2$ g Protein),

3. solche, welche zwar in Kochsalz löslich, durch Magnesiumsulfat aber nicht fällbar sind (0,082 g aus $^1/_2$ g Protein).

Die Trennung in diese drei Gruppen war deshalb um so interessanter, als sich herausstellte, daß die ersten beiden physiologisch unwirksam waren, während die dritte, die eigentlichen Albumine enthaltende Gruppe das wirksame Heufiebertoxin darstellte.

Auch auf die Hofmeistersche Methode, welche die Eiweißkörper in Globuline und Albumine trennt, kann man das Heufiebertoxin darstellen.

0,5 g Protein werden mit 20 ccm 2,5proz. Kochsalzlösung behandelt. Das Filtrat wird mit 20 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung auf Halbsättigung gebracht. Nach dem Absetzen des auf diese Weise gefällten Gesamtglobulins wird gegen destilliertes Wasser dialysiert. Das ausgeschiedene Euglobulin wird abzentrifugiert, getrocknet und zu 0,142 g befunden. Die Lösung, die Pseudoglobuline enthaltend, ist unwirksam. Bringt man jetzt die vom Gesamtglobulin abfiltrierte, halbgesättigte Ammonsulfatlösung auf Ammonsulfat-Ganzsättigung, so fällt nunmehr das Albumin aus. Diese Fällung wird wiederum gegen destilliertes Wasser dialysiert, getrocknet, gewogen und zu 0,0825 bestimmt. Diese Fällung ist physiologisch wirksam.

Bei beiden Darstellungsmethoden haben wir demnach fast übereinstimmende Ausbeuten an Heufiebertoxin gefunden und festgestellt, daß dieser wirksame Körper ein Albumin ist.

Es kam nunmehr noch darauf an, festzustellen, mit wieviel Verlust an Toxin unsere Arbeitsmethoden verbunden sind. Daß sie gleichwertig sind, kann man ohne weiteres daraus entnehmen, daß wir das eine Mal aus 0,5 g Protein 0,082 und nach Hofmeister 0,0825 g erhielten.

Stellt man sich aus dem ursprünglichen Protein (d. h. aus dem durch Kochsalz extrahierten, durch Alkohol gefällten Eiweißstoff) eine Lösung 1 : 40000 her, so ist ein Tropfen gleich $\frac{1}{30}$ ccm bei einem Heufieberpatienten noch deutlich wirksam. Diese Menge enthält $\frac{1}{1200}$ mg Protein. Wir setzen sie gleich einer toxischen Dosis und haben demnach in 0,5 g Protein 600000 toxische Dosen. Wieviel toxische Dosen sind nun in jenen 0,082 g Toxalbumin enthalten, welche wir aus 0,5 g Protein rein darstellten? Da wir mit der Proteinlösung 1 : 40000 als physiologisch gleichwertig eine Toxalbuminlösung von 1 : 100000 fanden, so ist zunächst zu konstatieren, daß diese letztere Lösung 1½fach wirksamer ist, als die Lösung des angewandten Proteins. Mit Rücksicht hierauf sind also in jenen 0,082 g Toxalbumin 246000 toxische Dosen enthalten. Da wir 600000 toxische Dosen hätten erwarten sollen, so ist durch die vorstehende Behandlung des Proteins etwas mehr als die Hälfte der wirksamen Substanz verloren gegangen.

Zur näheren Charakterisierung des Toxalbumins mögen noch die folgenden Angaben dienen, welche das Verhalten verschiedenen Temperaturen, Agenzien und Enzymen gegenüber festlegen.

Von einer Toxinlösung 1 : 10000 wurde je 1 ccm 1 Stunde lang auf die folgenden Temperaturen erhitzt:

1. Temperatur 60 bis 70°. Die klare Flüssigkeit wird leicht trübe. Die Prüfung ihrer physiologischen Wirksamkeit zeigt, daß eine Abnahme der Toxizität nicht erfolgt ist.

2. Temperatur 70 bis 80°. Die Lösung wird undurchsichtig, opalisierend. Die Prüfung der Toxizität ergibt eine Abnahme um etwa 1/4 des ursprünglichen Wertes.

3. Temperatur 80 bis 90°. In der stark opalisierenden Flüssigkeit tritt eine leichte Fällung ein. Die physiologische Wirkung ist dieselbe geblieben wie bei Versuch 2.

4. Temperatur 90 bis 100°. Ausfall dichter weißer Flocken. Die Toxizität ist um etwa 3/4 des ursprünglichen Wertes gesunken.

Temperaturen bis zu 70° sind also ohne schädigenden Einfluß auf das Toxin. Sogar das Erhitzen der Toxinlösung im Einschmelzrohr auf 120° eine Stunde lang vermag die Giftwirkung nicht völlig zu zerstören, da es bei nachfolgender Prüfung in Lösung 1:1000 noch stark wirksam ist. Erst längere Erhitzung im Einschmelzrohr auf 150° zerstört die giftigen Substanzen vollständig.

Verhalten des Toxins gegen Säuren und Alkalien.

1 g Roggenpollen wurde mit 10 ccm destilliertem Wasser und 2 ccm verdünnter Schwefelsäure, sodaß die Gesamtflüssigkeit etwa 2,5 proz. Schwefelsäure enthielt, während 5 Stunden bei 37° extrahiert. Die Aufschwemmung wurde nun zentrifugiert, der extrahierte Pollensatz mit 20 ccm destilliertem Wasser nachgewaschen und beide vereinigten Extrakte mit Kalilauge genau neutralisiert und mit der 8fachen Menge Alkohol gefällt. Der viel K_2SO_4 enthaltende Niederschlag wurde so lange im Schleicher-Schüllschen Dialysator gegen fließendes Wasser dialysiert, bis Inhalt des Dialysators und Dialysierflüssigkeit keine Schwefelsäurereaktion mehr gaben. Der Inhalt des Dialysators wurde dann zur Lösung der ausgeschiedenen Eiweißflocken mit 2,5 proz. Kochsalzlösung behandelt und wieder mit Alkohol gefällt. Der lufttrockene Rückstand wog 0,094 g. Hiervon wurde in 0,8 proz. Kochsalzlösung eine Verdünnung 1 : 1000 hergestellt. Sie gibt starke Molisch- und Biuretreaktion. In physiologischer Hinsicht ist die Lösung in der Verdünnung 1 : 10000 noch äußerst wirksam.

Ein immerhin ziemlich beträchtlicher Säurezusatz zu dem Roggenpollen hat also das Toxin nicht zu zerstören vermocht*). Alkalien scheinen einen etwas stärker schädigenden Einfluß auf das Gift auszuüben.

Es wurde wiederum 1 g Roggenpollen mit 10 ccm etwa 2,5 proz. Kalilauge 5 Stunden bei 37° ausgezogen. Nach dem Abzentrifugieren und Auswaschen wurde mit Salzsäure genau neutralisiert und im übrigen genau wie oben behandelt. Der zum zweiten Male mit Alkohol gefällte, sehr geringe Niederschlag wurde in 0,8 proz. Kochsalzlösung in der Verdünnung 1 : 1000 gelöst. Die Lösung gab starke Molisch-, gute Biuret- und Xanthoproteinreaktion. Die physiologische Wirkung ist in der Konzentration 1 : 1000 noch ziemlich stark, bei einer Verdünnung auf 1 : 10000 aber nur noch sehr gering. Eine Schädigung ist also zweifellos zu konstatieren.

---

*) Diese Säurebeständigkeit ist natürlich keine absolute. Schon die Eiweißnatur des Toxins läßt vermuten, daß geringe Schädigungen durch Säuren veranlaßt werden. Hiermit erklären sich die anscheinend abweichenden Resultate Dunbars, der das Toxin als säureempfindlich beschreibt. Dunbar verfügte damals über nur so geringe Mengen, daß schon die minimalste Schädigung dieser Dosis minima efficax einer Aufhebung der toxischen Wirkung gleichzusetzen war. Dasselbe gilt für seine ersten Untersuchungen über die Wärmebeständigkeit des Toxins.

Verhalten des Toxins gegen Enzyme.

0,2 g Roggenpollen-Protein wurden in 5 ccm 0,8 proz. Kochsalzlösung, der 0,25 Proz. Phenol zugesetzt war, gelöst, mit 2 ccm einer 5 proz. Trypsinlösung versetzt und die ganze Flüssigkeit mit 2 Tropfen verdünnter Sodalösung schwach alkalisch gemacht. Nach 5 tägigem Stehenlassen bei 37°, während welcher Zeit wiederholt geprüft wurde, ob noch Alkaleszenz vorhanden war, wurde der Versuch unterbrochen. Es hinterblieb ein schmutzig-schwarzer Rückstand, der mit Alkohol und Äther behandelt und getrocknet wurde. In 0,8 proz. NaCl aufgeschwemmt, lieferte die Lösung starke Reaktion nach Molisch, aber nur schwache Biuret- und Xanthoproteinreaktion. Die physiologische Wirkung war in der Stärke 1:1000 noch ziemlich heftig. Die ursprüngliche Lösung wurde mit Ammonsulfat auf Ganzsättigung gebracht, der nach einiger Zeit entstandene, geringe Niederschlag abzentrifugiert und gegen destilliertes Wasser dialysiert bis zum Verschwinden der Schwefelsäure-Reaktion. Die zurückgebliebene, trübe Lösung gab gute Probe nach Molisch und Biuretreaktion.

Die physiologische Wirksamkeit der aus der Ammonsulfatfällung erhaltenen Lösung war schwach, aber deutlich. Das Filtrat der Ammonsulfatganzsättigung war physiologisch völlig unwirksam.

Ähnlich verhält sich das Toxin der Pepsinsalzsäureverdauung gegenüber.

0,2 g Protein wurden unter Zusatz von 0,25 Proz. Phenol in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst, vom Ungelösten abzentrifugiert und die klare Flüssigkeit mit 2 ccm 10 proz. Pepsinsalzsäurelösung versetzt. Nach 24 stündigem Stehen bei 37° fielen hellbräunliche Flöckchen aus, die abzentrifugiert wurden und in später zu erörternder Weise untersucht wurden. Im übrigen war die weitere Verarbeitung dieselbe wie beim Trypsinversuch. Der durch Ammonsulfatganzsättigung erhaltene Niederschlag gab schöne Biuret- und Xanthoproteinreaktion, schwache Probe nach Molisch und war physiologisch schwach wirksam. Das Filtrat hiervon gab ebenfalls noch rötliche Biuretreaktion, war aber physiologisch unwirksam.

Die bei der Pepsinverdauung ausgeschiedenen Flöckchen, die oben erwähnt sind, waren in Wasser unlöslich, dagegen löslich in verdünnten Alkalien, aus denen sie beim Ansäuern mit verdünnter Essigsäure wieder ausfielen. Ihre Lösung in ganz schwach ammoniakhaltiger Kochsalzlösung zeigte die gewöhnlichen Fällungs- und Farbenreaktionen der Eiweißkörper. Beim Schmelzen mit Soda und Salpeter wurde mit Molybdänmischung eine starke Phosphorsäurereaktion erzielt; auch konnte in der Schmelze eine Spur Eisen nachgewiesen werden, aber kein Calcium, so daß der Phosphor als organisch gebunden betrachtet werden muß. Auf Grund dieser Befunde*) muß der vorliegende Eiweißkörper als ein Nukleoalbumin angesprochen werden. Physiologisch ist das Nukleoalbumin völlig unwirksam, kommt also für das eigentliche Heufiebertoxin nicht in Betracht.

---

*) Siehe Cohnheim, „Chemie der Eiweißkörper“.

Welch minimale Dosen des Toxins genügen, um bei Heufieberpatienten die typischen Reizerscheinungen hervorzurufen und welche Vorsicht man walten lassen muß, um bei Beurteilung eines vorliegenden, sich als wirksam erweisenden Körpers sich nicht irre leiten zu lassen, zeigt folgender Versuch, der einen Augenblick zu der Annahme führen konnte, es handle sich um ein Glykoproteid als wirksamen Bestandteil des Roggenpollens.

Versetzt man nämlich ein durch Berkefeldfilter filtriertes Extrakt aus Roggenpollen mit wenig verdünnter Schwefelsäure und erwärmt einige Zeit im Wasserbade, so kann man mit Kalilauge und Kupfersulfat eine schöne Reduktion erzielen, während eine mit Kalilauge versetzte Lösung ohne Erhitzen mit Schwefelsäure keine Reduktion nach Trommer gibt. Das durch diese Reaktion angezeigte Kohlehydrat wurde mittels des Osazons isoliert. Das klare Extrakt wurde mit salzsaurem Phenylhydrazin und Natriumacetat versetzt und etwa $^1/_2$ Stunde im Wasserbade erhitzt. Beim Erkalten schied sich eine gelbe, strahlige Kristallmasse aus, die, aus verdünntem Alkohol umkristallisiert, den Schmelzpunkt 203 bis 204° zeigte. Dieses isolierte, kristallinische Osazon erwies sich bei der Prüfung auf physiologische Wirksamkeit als äußerst wirksam. Bei später wiederholter Darstellung und mehrmaliger Umkristallisation jedoch stellte sich seine völlige Harmlosigkeit und Unwirksamkeit heraus. Es erklärt sich dies einfach damit, daß dem ersten Präparat noch verschwindend geringe Mengen von Eiweißstoffen angehaftet hatten, die erst durch mehrfache Kristallisation entfernt werden konnten.

Auch die Annahme, daß die Abspaltung eines reduzierenden Kohlehydrates durch Erwärmen mit verdünnten Säuren ein Glykoproteid verrate, erwies sich als irrig. Bei wiederholten Versuchen nämlich konnte dieses reduzierende Kohlehydrat direkt im Extrakt nachgewiesen werden, ohne erst durch Säuren abgespalten werden zu müssen. Es kommt also nicht, wie bei den Glykoproteiden, an Eiweiß gebunden vor, sondern ist schon als solches in der Lösung vorhanden.

Um noch einmal die wichtigsten Ergebnisse über die chemische Beschaffenheit des Heufiebergifts kurz zusammenzufassen, sei folgendes wiederholt:

1. Das Heufiebergift gehört zu den Toxalbuminen.

2. Es ist thermostabil.

3. Das Toxin ist säurebeständig, dagegen empfindlich gegen Alkalien.

4. Enzyme, wie Pepsin und Trypsin, vermögen es nicht völlig zu zerstören.

5. Es ist durch Ganzsättigung mit Ammonsulfat aus seinen Lösungen aussalzbar.

Dem Direktor des Instituts, Herrn Prof. Dr. Dunbar spreche ich für die gütige Anregung und Unterstützung vorliegender Arbeit meinen ergebensten Dank aus.

XXI.

Die Enzyme, namentlich das Chymosin, Chymosinogen und Antichymosin, in ihrem Verhalten zu konzentriertem elektrischem Lichte.*)

Von **Sigval Schmidt-Nielsen.**

I.

Trotzdem die Bedeutung des Lichtes für die Lebenserscheinungen sowohl der Tiere als der Pflanzen seit langem bekannt und anerkannt ist, besitzen wir doch wenig eingehende Kenntnisse über seine biochemische Wirksamkeit, die bekanntlich in den letzten Jahren durch Finsens Entdeckungen ein erhöhtes Interesse gewonnen hat. Obwohl diese Entdeckungen bis jetzt hauptsächlich therapeutischer Art sind, sowohl bei der sogenannten negativen Lichtbehandlung (Abwesenheit gewisser Teile des Spektrums), wie bei der positiven, so lehren sie doch, daß das Licht ein allgemeines biologisches Reagens sein muß.

Um die mannigfaltigen Wirkungen des Lichts, und insbesondere die des konzentrierten, auf alles Lebende zu verstehen, ist es natürlich von der allergrößten Wichtigkeit, zu wissen, ob es irgend einen chemischen Einfluß auf die Eiweißkörper oder die übrigen Protoplasmabestandteile ausübt.

Will man die mannigfaltigen biochemischen Probleme der Lichtbiologie mit Erfolg in Angriff nehmen, so muß man selbstverständlich mit dem lebenden Eiweiß arbeiten. Dies kann aber nicht geschehen, ohne daß die Enzyme mit ins Spiel kommen. Die Frage wird also in erster Reihe dahingehen, ob das Licht eine Wirkung auf die Enzyme und die mit denselben verwandten Agenzien ausübt.

*) Erscheint gleichzeitig unter dem Titel: „Virkningen af concentreret elektrisk Buelys paa Chymosin, Chymosinogen og Antichymosin in „Meddelelser fra Finsens med. Lysinstitut“ Bd. 9.

Hierüber liegen Untersuchungen von Downes und Blunt, Fermi und Pernossi, Reynolds Green, O. Emmerling, Fr. Weiss und H. v. Tappeiner vor; aber im ganzen ist die Frage bis jetzt fast unentschieden.

Die ersten Untersuchungen datieren aus dem Jahre 1878. Sie wurden von Downes und Blunt[1]) ausgeführt: Kochsalzgesättigte Invertinlösungen (durch Maceration aus Hefe dargestellt), wurden im Laufe von 3 Wochen bis zu 1 Monat dem Sonnenlicht ausgesetzt, und zeigten dann eine erheblich geringere Fähigkeit Rohrzucker zu invertieren als die im Dunklen aufbewahrten Kontrollproben. Die Versuche wurden in Glasgefäßen ausgeführt; wenn dieselben evakuiert waren, konnte kein schädlicher Einfluß beobachtet werden, weshalb die Verfasser annehmen, daß es sich um einen Oxydationsprozeß handelt, der nicht ohne Mithilfe von Sauerstoff stattfinden kann.

Fermi und Pernossi[2]) fassen selbst ihre Untersuchungen (1894) dahin zusammen, daß Lösungen von Pepsin und Trypsin im Sonnenlicht mehr abgeschwächt werden als beim Aufbewahren im Dunklen. Indessen dürften es andere schwierig finden, dies auf Grund der Tabelle ihrer Einzelbeobachtungen als bewiesen anzusehen. In einer anderen Versuchsreihe wurden verflüssigte Bakterienkulturen 200 Stunden lang dem Sonnenlichte ausgesetzt. Im Vergleiche mit den im Dunkeln gehaltenen Kontrollproben zeigte es sich, daß die Fähigkeit, Gelatine zu verflüssigen, auf $^1/_2$ bis $^1/_7$ vermindert war.

Emmerling[3]) fand (im Jahre 1901), daß das Sonnenlicht im allgemeinen nur von geringer Wirkung ist. Oft konnte ein schädlicher Einfluß kaum nachgewiesen werden (Invertin, Lactase, Emulsin, Amylase). Sichere Wirkung wurde bei Chymosin und Maltase (Hefeextrakt) beobachtet. Pepsin und Trypsin gegenüber erwies sich das Sonnenlicht bald als abschwächend, bald als einflußlos, was auf die methodischen Fehler (im Nachweis der Enzymmengen) zurückgeführt wird. Die Versuche wurden mit 1proz. durch Toluol konservierten wässerigen Lösungen in vollgefüllten Glasgefäßen ausgeführt. Die Belichtung geschah durch 5 Tage teils mit zerstreutem, teils mit direktem Sonnenlichte.

Weiss[4]) gibt an (im Jahre 1901), daß mehrstündige Einwirkung von Sonnenlicht keine sichere Wirkung auf die proteolytischen Enzyme des Malzes erkennen läßt.

v. Tappeiner[5]) und Stark[11]) haben jüngst (September 1903) sehr interessante Mitteilungen über die Wirkung des Lichtes

auf Enzyme bei Anwesenheit fluoreszierender Stoffe (Sensibilisatoren) veröffentlicht. Während das Sonnenlicht auf die reinen Enzymlösungen ohne Einfluß war, wurden sie nach Zusatz sehr kleiner Mengen von Eosin und anderen fluoreszierenden Körpern stark abgeschwächt (weiteres siehe S. 369).

Alle diese Versuche sind mit dem Fehler behaftet, daß sie in gewöhnlichen Glasgefäßen (Kolben, Proberöhrchen usw.) ausgeführt sind. Dadurch ist einerseits ausgeschlossen, daß die Flüssigkeit gleichmäßig durchleuchtet wird, denn dies kann nur in einem Gefäße mit planparallelen Wänden geschehen, andererseits werden die ultravioletten Strahlen von Glas absorbiert und da diese nach unseren bisherigen Kenntnissen diejenigen sind, die hauptsächlich die chemischen Wirkungen ausüben, so kann diesen Versuchen für die lichtbiologischen Fragen nur geringe Bedeutung beigemessen werden.

Die einzige mir bekannte Arbeit, die sich unter genügender Berücksichtigung sowohl der physikalischen wie der chemischen Seite mit der Frage beschäftigt, ist die von Green[6]) über die Wirkungen des Lichtes auf Diastase. Die Untersuchungen waren veranlaßt durch die Beobachtungen von Brown und Morris[7]), denen zufolge die Menge der Diastase im Pflanzenlaub bei starker Beleuchtung rasch abnimmt, und zeigten, daß das Licht im großen und ganzen einen zerstörenden Einfluß auf die diastatischen Enzyme ausübt, ob sie nun vegetabilischen oder animalischen Ursprunges sind.

Ich werde später auf Einzelheiten in den interessanten Mitteilungen Greens zurückkommen. An dieser Stelle sei nur das Ergebnis erwähnt, daß, während die ultravioletten Strahlen einen zerstörenden Einfluß zeigten, der schwächer brechbare Teil des Spektrums einen günstigen Einfluß ausübte, insofern als das Diastasezymogen dadurch aktiviert wurde.

Green hat in seinen Versuchen sowohl das Sonnenlicht wie das Licht einer elektrischen Bogenlampe von etwa 2000 Normalkerzen Lichtstärke benutzt. Um auf diesem Wege sichere Wirkungen zu erhalten, wäre es notwendig, die Beleuchtung längere Zeit (einige bis 24 Stunden) einwirken zu lassen. Dies ist natürlich vom rein methodischen Gesichtspunkte unvorteilhaft, weil dann Antiseptika zugesetzt werden müssen, und diese neben den Bakterien auch die Enzyme bedeutend beeinflussen können.

Mit Hilfe der von Finsen konstruierten Sammelapparate dagegen kann man bei den verschiedensten Organismen Lichtreaktionen in einem Bruchteile der sonst benötigten Zeit erhalten

und positive Befunde erzielen, wo man früher zweifelhaft war. Um den chemischen Problemen der Lichtbiologie näher zu treten, war somit eine Untersuchung der Wirkungen des konzentrierten Lichtes auf Enzyme wünschenswert.

Durch das freundliche Entgegenkommen des Herrn Professor Finsen und des „Fritjof Nansens Fond til Videnskabens Fremme“ konnte ich im Sommer 1903 in Finsens Lichtinstitute in Kopenhagen dieser Frage in aller Kürze näher treten. Ehe ich die Versuchsergebnisse bespreche, möchte ich auch an dieser Stelle Herrn Professor Niels R. Finsen meinen herzlichsten Dank aussprechen.

II. Versuchsanordnung.

Wie oben erwähnt, war die Versuchsanordnung hauptsächlich auf die Verwendung konzentrierten elektrischen Kohlenbogenlichtes begründet. Dieses war von derselben Intensität, wie es in Finsens Lichtinstitut für die Lupusbehandlung verwendet wird, d. h. es kommt eine Bogenlampe von 50 Volt 50 Ampère mit Kohlenelektroden von 24 respektive 17 mm Durchmesser und Finsens 12,5 cm-Konzentrationsapparat zur Verwendung. Die ganze Anordnung ist aus Fig. 1 ersichtlich.

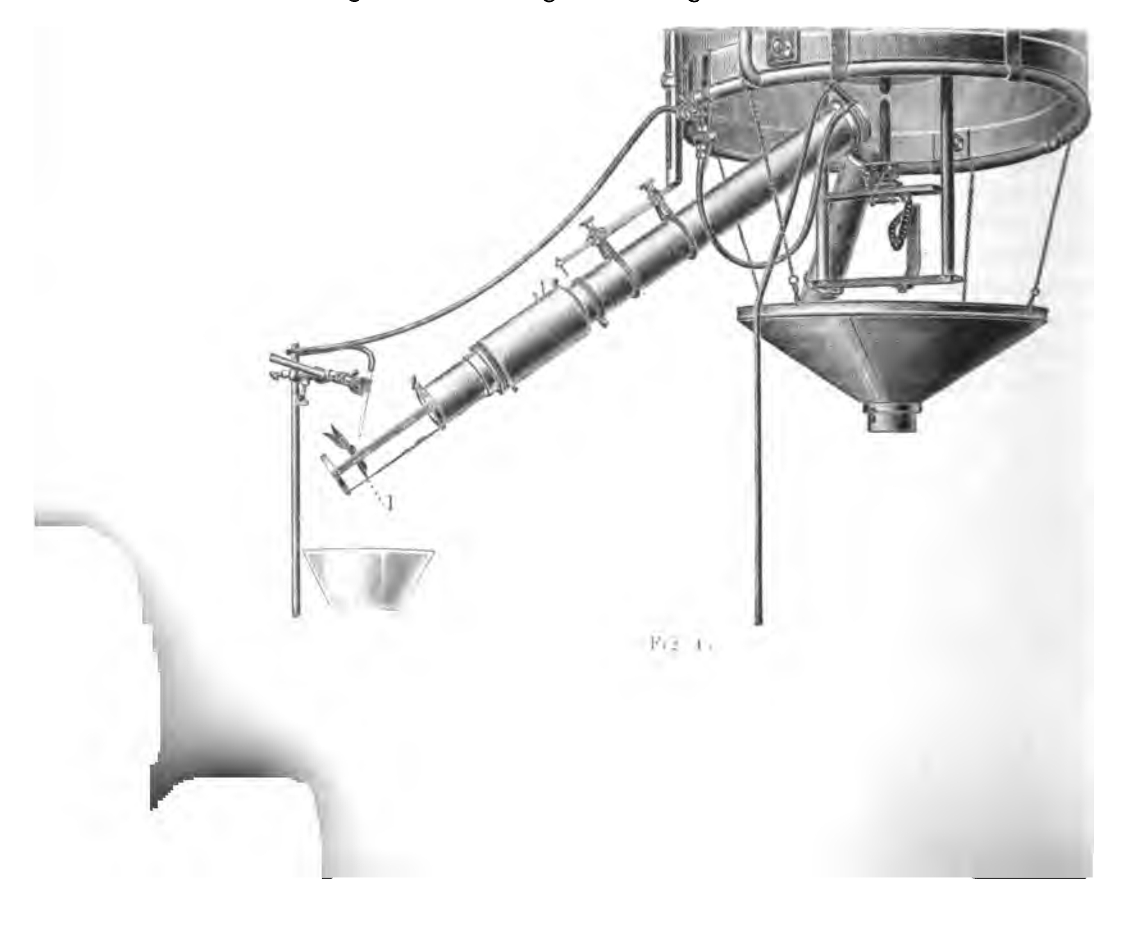


Fig. 1.

Der unter 45° schräg gestellte Konzentrationsapparat besteht, wie bekannt, aus einem System von Quarzlinsen, wodurch das aufgesammelte Licht so konzentriert wird, daß es im Lichtpunkte (Bildpunkt!) — bei *l* in Fig. 1 — etwa 350 mal stärker als unter 45° in 1 m Abstand von den Elektroden ist.

Als ein Maß für die Lichtintensität kann man diejenigen Strahlen verwenden, die vom Auge aufgefaßt werden.

Nach der gewöhnlichen Schätzung der Lichtstärke der Bogenlampen dürfte dann die Intensität im Lichtpunkte etwa 2 Millionen Normalkerzen repräsentieren. Bezüglich der Einzelheiten sei auf die „Mitteilungen aus Finsens medizinischem Lichtinstitute", wo der Apparat genauer beschrieben ist, verwiesen.

Chemische Untersuchungen machen im allgemeinen größere Ansprüche an die Menge des Materials als mikrobiologische. Während bei letzteren die Durchleuchtung eines einzigen Tropfens ausreichen kann, fordern die ersteren meßbare, wenngleich je nach der Art des Materials verschiedene Mengen Substanz. Bei Katalysatoren, deren Leistungsfähigkeit nicht direkt von der Substanzmenge abhängig ist, kann die Menge geringer sein. Indessen wird es am besten sein, die größtmöglichen Flüssigkeitsmengen durchleuchten zu lassen. Auf der anderen Seite aber kann das konzentrierte Licht nur auf eine ganz kleine Fläche, der Größe der Lichtpunkte entsprechend, wirken. Diese Fläche wird größer mit dem Abstand von der hinteren Linse, aber dabei nimmt auch die Intensität mit dem Quadrate des Abstandes ab. Das Maximum von Lichtwirkung erhält man dort, wo das Lichtbild am kleinsten ist — und dieser Größe muß das Versuchsgefäß angepaßt sein.

Kleine Kolben und Röhrchen lassen sich nicht verwenden, da sie sich nicht gleichmäßig durchleuchten lassen, und auch nicht ohne große Mühe aus Quarz erhalten werden können. Um den ultravioletten Strahlen den Durchtritt zu ermöglichen, war es notwendig ein Versuchsgefäß aus Quarz anzuwenden.

Ich war mit einer flachen zylindrischen Kammer, aus einer ringförmigen Glasscheibe und zwei planparallelen Quarzplatten zusammengestellt, sehr zufrieden.

Die Anordnung ist aus nebenstehenden Figuren ersichtlich, wovon Fig. 2 die Kammer von vorne (also in der Richtung der Beleuchtung), Fig. 3 von der Seite gesehen und Fig. 4 im Querschnitt durch die Mitte zeigt.

Wenn man die Dicke des Glasringes (Fig. 5) ändert, so erhält man Kammern verschiedener Größe. Gewöhnlich war der Glasring 3,2 mm dick und der zentrale Teil, der durchleuchtet wird, faßte dann genau 1 ccm. Sämtliche 3 Teile waren plan geschliffen und es war unschwer, sie mit Hilfe einer dünnen Vaselinschicht durch Adhäsion mit einander fest zu verbinden. Die Kammer konnte mit Leichtigkeit aus einander genommen werden und wurde vor jedem Versuche gereinigt.

Die zu untersuchende Flüssigkeit wurde durch die Mündung *d* mittelst einer Pasteurschen Pipette eingefüllt und entleert. Während der Versuche war *d* mit einer Wachsplatte verschlossen.

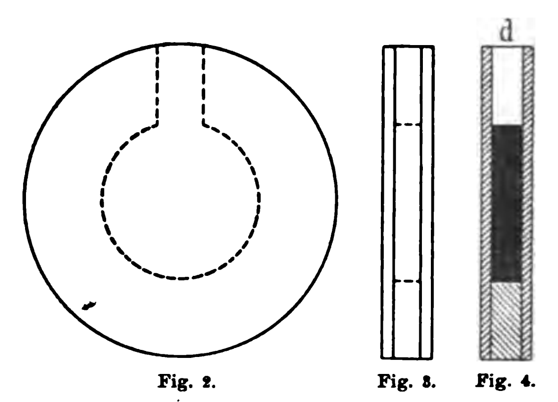


Fig. 2. Fig. 3. Fig. 4.

Die Versuchskammern wurden durch einen Schalenhalter (*l* in Fig. 1) in einem fixen Abstande von dem Konzentrationsapparate festgehalten, und zwar so, daß das Lichtbild eben die Mittelpartie der Kammer reichlich deckte. Die Kammer wurde während der Belichtung stetig mit Wasser berieselt; ihre Temperatur war nicht höher als 15 bis 20°. Trotz der hohen Temperatur im Lichtpunkt (240°) hat man es somit nicht mit einer Wärmewirkung zu tun. Außer diesen Kammern benützte ich auch andere, die durch ein Querstück (*t* in Fig. 6) in zwei Abteilungen geteilt waren, und somit die gleichzeitige einheitliche Beleuchtung zweier Portionen gestatteten.

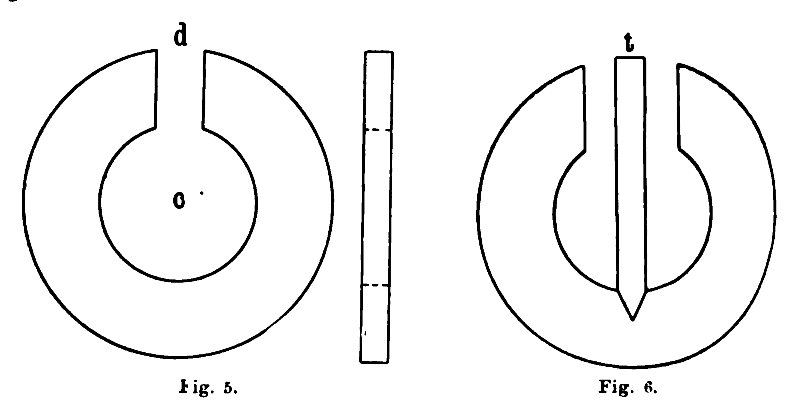


Fig. 5. Fig. 6.

Die Kammern, die zur Beleuchtung mit diffusem elektrischen Lichte und mit Sonnenlicht verwendet wurden, waren nach demselben Prinzip wie die gewöhnlichen konstruiert. Der Durchmesser war jedoch 8 cm, die Dicke gewöhnlich 1,6 mm.

Gestatten nun diese Kammern eine wirkliche Durchleuchtung? Diese Frage glaube ich bejahen zu müssen. Die Kammern waren

vom Lichtbilde (dem Querschnitt des Lichtkegels an der betreffenden Stelle) völlig gedeckt. Es ist zwar nicht zu vermeiden, daß am Rande einzelne kleine Schatten werfende Vaselintropfen austreten, aber im großen und ganzen ist die Durchleuchtung vollständig.

In einem Versuche wurde eine 24 Stunden alte Kultur von Bac. prodigiosus 30 Minuten lang in einer 3,2 mm-Kammer belichtet. Bei Überimpfung auf Nährsubstrate zeigte sich trotz sehr reichlicher Aussaat, daß die Bouillon steril blieb, während auf Agar-Agar, Gelatine, Kartoffelscheiben 10 bis 12 Kolonien heranwuchsen, was ja unter Berücksichtigung des Vaselinrandes, wo die baktericiden Strahlen nicht durchdringen, ein günstiges Resultat ist.

Wo nichts anders bemerkt ist, konnte das gesamte Spektrum wirken. Wenn die Wirkungen der verschiedenen Spektralabschnitte untersucht werden sollten, wurden Absorptionsfilter im Lichtkegel zwischen die Versuchskammer und den Konzentrationsapparat eingeschaltet. Die Absorptionsfilter waren parallelepedische Glasgefäße mit planparallelen Wänden in 1 cm Abstand. Je nachdem, ob die ultravioletten oder alle Strahlen unter einer gewissen Wellenbreite ausgelöscht werden sollten, wurden die Filter mit Wasser oder mit Chininsulfatlösung, Fuchsinlösung, Kaliumchromatlösung u. dgl. gefüllt.

Die ersten Versuche wurden mit Pepsin und Papayotinlösungen ausgeführt. Es stellte sich als unzweifelhaft heraus, daß sie in hohem Maße beeinflußt wurden. Es erwies sich indessen bald als unmöglich, mit den kleinen Mengen Lösung (1 ccm), womit ich arbeiten mußte, eine sichere Vorstellung von der Größe der bewirkten Änderungen zu erhalten.

Um quantitative Bestimmungen an proteolytischen Enzymen auszuführen, sind recht erhebliche Materialmengen notwendig, ob man nun Fibrin, koaguliertes Eierklar, Gelatine usw. verwendet. Ehe ich einige Erfahrung gewonnen hatte, fand ich es am zweckmäßigsten, das Verhalten des Chymosins zu studieren, zum Teil, weil es immer in relativ konzentriertem und einheitlichem Zustande leicht zugänglich ist, hauptsächlich aber, weil die Bestimmung der Koagulationswirkung Milch gegenüber ein ausgezeichnetes Maß für die relative Enzymmenge abgibt, und sich überdies mit sehr kleinen Flüssigkeitsmengen ausführen läßt.

Die Wirksamkeit der Chymosinlösungen wird bekanntlich durch die Koagulationszeit bestimmt. Im nachstehenden wird immer die Zeit angegeben, die notwendig war, um bei Zusatz von 0,1 ccm Enzymlösung 10 ccm Kuh- oder Ziegenmilch bei einer Temperatur von 35 bis 37° zur Gerinnung zu bringen.

In einzelnen meiner Versuche betrug die Koagulationszeit mehrere Stunden und darüber: es war somit notwendig, nur absolut frische Milch zu verwenden, sonst hätten Mikroorganismen während der langdauernden Aufbewahrung bei Körpertemperatur leicht ihre Acidität verändern können.

Milch, die kurz nach dem Melken (4 bis 5 Stunden) aus der Meierei erhalten wurde, erwies sich an schwülen Sommertagen als unzuverlässig, weshalb ich meist Ziegenmilch benutzte, die unmittelbar vor dem Versuche im Laboratorium gemolken wurde.

Ich brauche nicht hinzuzufügen, daß außerdem Kontrollproben während der ganzen Versuchszeit im Thermostaten aufbewahrt wurden. Zeigten sich diese einer normalen Chymosinlösung gegenüber nicht unverändert, so wurde die ganze Versuchsreihe außer Betracht gelassen.

Die Versuchsanordnung war so getroffen, daß alle zur selben Reihe gehörigen Koagulationsversuche im gleichen Zeitpunkt begannen. Zuerst wurde die Enzymlösung mit einer Kaliberpipette abgemessen, dann die Milch zugesetzt, indem für jede Probe eine Rennuhr arretiert wurde.

Was die relative Genauigkeit dieses Verfahrens betrifft, sei erwähnt, daß Parallelversuche für die kurzen Koagulationszeiten selten Differenzen von mehr als 1/4 Minute zeigten, für Koagulationszeiten von mehreren Stunden ein paar Minuten.

III. Wirkung auf das Chymosin.

Die Wirkung des Lichtes auf das Chymosin als solches ist von der Intensität des verwendeten Lichtes, von der Dauer der Belichtung und den Konzentrationsverhältnissen der Enzymlösung abhängig.

Was zunächst die Lichtintensität betrifft, so übt das Sonnenlicht und das nicht konzentrierte Licht von elektrischen Bogenlampen nur eine schwache Wirkung aus, wie aus den folgenden Versuchen hervorgeht.

Versuch XL. 24. Juli 1903.

Gewöhnliches Käselabextrakt von Chr. Hansen wurde aufs 20fache verdünnt (1 Vol. Extrakt auf 19 Vol. Wasser) und in einer 1,5 mm-Quarzkammer belichtet. Die Belichtung wurde auf dem flachen Dache des Laboratoriums vorgenommen und zwar so, daß die Strahlen während der ganzen Zeit senkrecht auf die Kammer fielen.

Die Gerinnungszeit wurde sofort nach der Belichtung festgestellt und betrug bei einer Belichtungsdauer

von 60 Min. . . . . 3 1/2 Min.
„ 120 „ . . . . 3 3/4 „
„ 220 „ . . . . 3 3/4 — 4 „
Für die unbelichtete Kontrollprobe fand ich 3 3/4 „

In einem zweiten ähnlichen Versuche am 25. Juli 1903:
Nach 270 Min. . . . . 4 1/2 Min.
Für eine unbelichtete Kontrollprobe 3 1/4 „

Man sieht, daß diese kurzdauernde Belichtung eine deutliche aber nur schwache Wirkung hatte. Versuche mit lang-

dauernder Belichtung hätten nur unter Zusatz störender Antiseptika ausgeführt werden können. Da solche Versuche weniger Interesse darbieten, habe ich davon Abstand genommen.

Statt dessen erlaube ich mir einen mir damals unbekannten Versuch von O. Emmerling[3]) anzuführen.

Eine mit Toluol konservierte Chymosinlösung (A) wurde 5 Tage hindurch teils dem diffusen Tageslichte (B), teils dem direkten Sonnenlichte (C) exponiert. Die Koagulationszeit betrug:

Für A (Kontrollversuch) 8 Min.
„ B „ $12^{1}/_{4}$ „
„ C „ 21 „

Nach Belichtung mit direktem Sonnenlichte ist also die wirksame Chymosinmenge bis auf ein Drittel reduziert, und dies trotzdem die Belichtung in einem Glasgefäße vorgenommen wurde.

Das diffuse elektrische Licht einer Bogenlampe von [illegible]5 Volt, 30 Ampère und Kohlenelektroden von 24 und 18 mm Durchmesser bot eine etwas kräftigere Wirkung, wie aus folgendem Versuch hervorgeht.

Versuch XXIX. 13. Juli 1903.

Eine $^{1}/_{10}$ Lablösung wird in einer 3,2 mm-Quarzkammer in 30 cm Abstand dem Lichtbogen exponiert. Die Koagulationszeit betrug:

Nach 30 Min. Belichtung . . . 5 Min.
„ 120 „ „ . . . $11^{1}/_{2}$ „
Für die unbelichtete Kontrollprobe 3 „

In den Versuchen mit konzentriertem elektrischem Licht war einerseits die Dauer der Belichtung, andererseits der Einfluß der Konzentration auf den Verlauf festzustellen.

Der Einfluß der Belichtungszeit wurde an Lösungen von gleicher Konzentration festgestellt.

Hierzu wurde Hansensches, auf $^{1}/_{10}$ verdünntes Labextrakt verwendet. Die verdünnten Lösungen wurden für jede Versuchsreihe frisch aus der Standardlösung bereitet. Die Belichtung geschah in 3,2 mm-Quarzkammern und zwar so, daß in der möglichst kürzesten Zeit Proben durch 5, 10, 15, 20, 25 Minuten belichtet wurden. Sobald eine Serie fertig belichtet war, wurden alle Koagulationsproben gleichzeitig angestellt.

Tabelle I.

Die Probe belichtet	Koagulationszeit für 0,1 ccm Chymosinlösung und 10 ccm Ziegenmilch				
	Vers. XVI	Vers. XVIII	Vers. XXI	Vers. XXII	Vers. XXIII
0 Min.	3 Min.	2 Min.	3 Min.	$3^{1}/_{2}$ Min.	$3^{1}/_{2}$ Min.
5 „	$7^{1}/_{4}$ „	$17^{1}/_{2}$ „	$5^{1}/_{2}$ „	$5^{3}/_{4}$ „	$6^{3}/_{4}$ „
10 „	$11^{1}/_{2}$ „	51 „	$6^{1}/_{2}$ „	$8^{1}/_{2}$ „	$9^{1}/_{4}$ „
15 „	20 „	58 „	$9^{1}/_{2}$ „	$9^{1}/_{2}$ „	$11^{1}/_{2}$ „
20 „	31 „	160 „	11 „	11 „	$12^{1}/_{2}$ „
25 „		270 „	25 „	14 „	18 „

Tabelle II.

Die Probe belichtet	Die Koagulationszeit für 0,1 ccm Chymosinlösung und 10 ccm Kuhmilch							
	Vers. IX	Vers. X	Vers. XV	Vers. XVI	Vers. XVIII	Vers. XXI	Vers. XXII	Vers. XXIII
0 Min.	6 Min.	5 1/4 Min.	7 1/2 Min.	8 Min.	8 1/2 Min.	8 Min.	8 Min.	8 Min.
5 „		7 1/4 „	20 „	18 „	30 „	15 „	12 „	11 1/2 „
10 „	13—14 „	11 1/2 „	35 „	30 „	150 „	19 „	18 „	16 1/2 „
15 „	16 1/2 „	15 „	50 „	55—60 „	170 „	31 „	24 „	22 1/4 „
20 „		17 3/4 „	80 „	82 „	mehr als 360 Min.	34 „	30 „	27 „
25 „			175 „			90 „	34 „	37 „
30 „	32 „	30 „	210 „				53 „	
60 „		85 „						

Die zu verschiedenen Zeiten (im Monate Juni und Juli 1903) gewonnenen Resultate sind in den Tabellen I und II zusammengestellt. I gibt die mit Ziegenmilch, II die mit Kuhmilch gefundenen Koagulationszeiten an.

Man sieht, daß mit der zunehmenden Dauer der Belichtung auch die Koagulationszeit steigt, d. h. die wirksame Chymosinmenge wird verringert.

Bei graphischer Darstellung der erhaltenen Zahlen erhält man für den Verlauf der Zerstörung des Labs in allen Reihen regelmäßige Kurven vom gleichen Typus. Betrachtet man dagegen die Wirkung bestimmter Belichtungszeiten, z. B. von 10 Minuten, in den verschiedenen Versuchen, so wird man von der großen Ungleichheit der Resultate überrascht. Setzt man die Wirkung in einer willkürlich gewählten Reihe gleich 1, so ist sie in einer anderen Versuchsreihe, unter anscheinend völlig denselben Bedingungen gleich 10; in diesem Falle sind aber auch die übrigen Einzelbeobachtungen entsprechend höher. Andere Reihen zeigen dagegen untereinander gute Übereinstimmung.

Am Finsenschen Lichtinstitute hat man schon früher sowohl bei den mikrobiologischen wie bei den klinischen Untersuchungen Unregelmäßigkeiten in der Wirksamkeit des Lichtes beobachtet, ohne daß die Frage näher untersucht wurde; einmal, weil es bei den klinischen Untersuchungen kaum möglich ist die Reaktion zu messen, zweitens, weil bei den mikrobiologischen Untersuchungen schon in kurzer Zeit eine Maximalwirkung erreicht wird.

Obwohl die Variationen, prozentisch berechnet, auch bei den letztern dieselben sind, so reichen sie doch, in absoluten Zahlen ausgedrückt, nicht aus, sich in dem Maße geltend zu machen, wie bei chemischen Versuchen, namentlich solchen mit Katalysatoren, wo eine kleine Änderung der wirksamen Substanzmenge einen großen Ausschlag bewirkt.

Im Anfange war ich geneigt, die Ursache dieser Verschiedenheit in Ungleichheiten der verwendeten Enzymlösung oder der Ausführung der Koagulationsversuche zu suchen. Da für alle Lablösungen ein und dasselbe Labextrakt als Vergleichslösung verwendet wurde, war die erste Vermutung nicht haltbar. Dagegen konnte man an eine wechselnde Acidität der Milch denken. Diese änderte sich zuweilen während einiger Stunden recht erheblich — und man weiß ja, daß eine Änderung der Acidität die Labgerinnung ganz besonders beeinflußt. Bei kurzen Koagulationszeiten brauchte sich dies nicht merklich geltend zu

machen, brauchte daher auch nicht durch die Kontrollprobe entdeckt zu werden; bei den langdauernden Versuchen hätte sie allenfalls die Resultate störend beeinflussen können.

Die Resultate blieben indessen dieselben, als ich Parallelversuche mit im Laboratorium unmittelbar vor dem Versuch gemolkener Ziegenmilch anstellte, und damit völlig entsprechende Zahlen erhielt.

Sonach blieb nichts übrig als die Ursache in einer wechselnden Intensität des Lichtes oder korrekter ausgedrückt, in einer wechselnden Menge der von der Versuchsflüssigkeit absorbierten chemisch wirksamen Strahlen zu suchen, was ja wieder entweder auf Variationen in der Lichtquelle selbst oder auf die Absorptionsverhältnisse des Versuchsobjektes zurückzuführen wäre.

Wie ich auf S. 367 näher auseinandersetze, hängt die enzymzerstörende Wirkung des Lichtes fast ausschließlich von den ultravioletten Strahlen ab. Diese werden bekanntlich leicht von kleinen Verunreinigungen absorbiert, und man konnte denken, daß der Konzentrationsapparat, der, die Frontlinse ausgenommen, nur einmal in der Woche gereinigt wurde, einen solchen Einfluß ausüben konnte. Doch war auch dies nicht der Fall.

Ich verzichte darauf an dieser Stelle meine Mutmaßungen näher auszuführen. Es sei nur bemerkt, daß die Ursache darin zu suchen ist, daß es mit Kohlenelektroden nicht gelingt, Licht von konstantem Gehalt an ultravioletten Strahlen zu erhalten, was übrigens nach den Untersuchungen von Snow[8]), daß diese Teile des Spektrums vom Lichtbogen und den gasförmigen Bestandteilen desselben herrühren, vorauszusehen war.

Ich habe deshalb darauf verzichten müssen, die quantitativen Verhältnisse der Zerstörung festzustellen. Dies wird erst möglich sein, wenn es gelingt eine Lichtquelle mit a priori konstantem Lichte zu erhalten.

Der Einfluß der Enzymmenge auf den Verlauf der Zerstörung wurde in Versuchen mit konstanter Belichtungszeit festgestellt.

Das Labextrakt wurde teils in konzentriertem Zustande, teils in verschiedenen Verdünnungen in einer 3,2 mm weiten Quarzkammer 30 Min. lang im Lichtfleck einer Lampe von 50 Volt und 50 Ampère gehalten, dann wurden sämtliche Proben auf die gleiche Verdünnung gebracht, so daß 0,1 ccm der zu den Koagulationsversuchen zu verwendenden Lösung immer derselben Menge der ursprünglichen Lösung entsprach.

Die gewonnenen Resultate finden sich in Tabelle III verzeichnet.

Tabelle III.

Konzentration bei der Belichtung (30 Min.)	Konzentration bei den Koagulations-Versuchen	Koagulationszeit für 0,1 ccm Chymosinlösung zu 10 ccm Kuhmilch			
		Vers. XI.	Vers. XII	Vers. XIII	Vers. XIX
1/2	1/20		12 Min.	9 Min.	9 1/4 Min.
1/5	1/20	18 1/4 Min.	22 „	15 1/2 „	20 3/4 „
1/10	1/20	21 „	135 „	35 „	68 „
1/15	1/20	40 „	220 „	100 „	210 „
1/20	1/20	68 „	mehr als 300 Min.	125 „	
unbelichtet.	1/20	7 1/2 „	8 „	5 „	6 3/4 „

Man sieht, daß die Zerstörung des Labferments mit der Verdünnung ansteigt. Die Ursache davon ist einerseits gewiß darin zu suchen, daß die konzentrierten Lösungen eine gelbe Farbe besitzen, wesentlich aber, wie schon Green[6]) für die Diastase gefunden hat, in einem höheren Gehalt an kolloidalen Molekülen. Bei Chymosinlösungen derselben Färbung zeigte sich nämlich die Zerstörung dort am wenigsten ausgesprochen, wo ein wenig Eiweißlösung hinzugefügt war.

In solchen Versuchen macht sich natürlich der Wechsel der Lichtwirkung entsprechend geltend, und es konnten daher ins einzelne gehende Versuche vorläufig nicht ausgeführt werden.

IV. Die wirksamen Strahlen.

Green hat gezeigt, daß die die Diastase unwirksam machenden Strahlen dem ultravioletten Teil des Spektrums angehören, und es ließ sich vermuten, daß dies auch für andere Enzyme der Fall sein dürfte, namentlich da die ultravioletten Strahlen sich hauptsächlich als die chemisch wirksamen erwiesen haben.

Die Richtigkeit dieser Behauptung geht aus einer Reihe von Beobachtungen hervor. Wie bekannt können die ultravioletten Strahlen Glas nicht durchdringen; wird nun eine klare Glasplatte vor die Versuchskammer eingeschoben, so bleibt eine 30′ dauernde Belichtung ohne Einfluß auf 1/20-Labextrakt.

Als Beispiel führe ich in Tabelle IV einen Versuch an, wo die verschiedenen Spektralabschnitte auf ihre Wirkungen untersucht wurden in der Art, daß ich verschiedene Lichtfilter vor die Versuchskammer brachte.

Die anderen Teile des Spektrums sind also allein genommen auch ohne Einfluß auf das Chymosin.

Tabelle IV.

Art des Filters	Belichtungszeit	Koagulationszeit für 0,1 ccm zu 10 ccm Ziegenmilch
Keines	30 Min.	35 Min.
Ungefärbtes Glas	„ „	3 „
$1^1/_2$ bis 2 proz. Chininlösung	„ „	3 „
$^1/_5$ proz. Fuchsinlösung	„ „	3 „
5 proz. K_2CrO_4-Lösung	„ „	3 „
Kontrollprobe	0	3 „

Wenn die Dauer der Belichtung auf 2 bis 3 Stunden ausgedehnt wurde, verlängerte sich die Koagulationszeit um $^1/_4$ bis $^1/_2$ Min.; dies liegt aber innerhalb der Grenze der Versuchsfehler.

Vergleicht man diese Resultate mit jenen von Emmerling (S. 363), so fällt auf, daß das konzentrierte Licht ohne Einfluß bleibt, wenn die ultravioletten Strahlen entfernt werden. Doch sind weitere Versuche erwünscht, da die Angaben über Versuche mit Tageslicht recht unsicher sind.

V. Nachwirkung des Lichtes.

In der ganzen Lichtbiologie kehrt stets die Eigentümlichkeit wieder, daß die Lichtwirkung — die Reaktion — sich nicht sofort einstellt, sondern erst nach einiger Zeit. Die Nachwirkungen sind somit oft eben das Charakteristische.

Für die Wirkungen des Lichtes auf anorganische Substanzen ist ähnliches bekannt, was zuerst von Bunsen und Roscoe[12]) in ihren klassischen Untersuchungen über die Wirkung des Lichtes auf Chlorknallgas als photochemische Induktion bezeichnet wurde.

In seiner Arbeit über die Diastase führt Green[6]) an, daß eine Diastaselösung, die durch Beleuchtung um 42 Proz. abgeschwächt worden war, nach 6wöchentlicher Aufbewahrung im Dunkeln nur noch Spuren von Diastasewirkung aufwies.

Es kann nicht befremden, daß ein vom Lichte eingeleiteter chemischer Prozeß, namentlich wegen der Reaktion der Zwischenprodukte, eine gewisse Zeit braucht um abzulaufen, bzw. den Gleichgewichtszustand zu erreichen. Meine eigenen Versuche sind in dieser Richtung recht unvollständig.

Bei einigen Proben, die zufälligerweise nach der Belichtung etwa 12 Stunden in einem verschlossenen Glasröhrchen stehen blieben, waren die Koagulationszeiten von $3^1/_4$ zu $4^3/_4$ Min., von 4 zu $5^5/_4$ Min., von $11^1/_4$ zu $17^1/_2$ Min. und 23 zu 31 Min. ange-

wachsen. Nach 24stündigem Stehen ergab sich in einem anderen Fall eine noch erheblichere Herabsetzung der Wirksamkeit, indem die Koagulationszeit von $9^1/_4$ auf $20^1/_2$ Min., von $11^1/_2$ auf 36 Min., von $12^1/_2$ auf 33 Min. anstieg. Die verwendete Milch zeigte normaler Lablösung gegenüber in allen Bestimmungen die gleiche Koagulationszeit.

Außer diesen mehr gelegentlichen Beobachtungen führe ich die folgenden zwei Spezialversuche an, obwohl die Resultate weniger schlagend sind.

Versuch XXXI. 14. Juli 1903.

$^1/_{10}$ Labextrakt wurde 20 Min. lang in der 3,2 mm-Kammer mit konzentriertem Lichte belichtet. Die Koagulationszeit für Ziegenmilch betrug:

Sofort	$18^1/_2$	Min.,
nach 8 Stunden	19	„
„ 25 „	25	„
„ 31 „	24	„

Versuch IL. 28. Juli 1903.

$^1/_{10}$ Labextrakt wird 15 Min. lang belichtet. Die Koagulationszeiten für Ziegenmilch betrugen:

Sofort	$12^1/_2$	Min.,
nach 3 Stunden	11	„
„ 20 „	$13^1/_2$	„

während die unbelichtete Kontrollprobe 3 Min. brauchte.

Wie die Nachwirkungen sich in langen Zeiträumen (d. h. unter antiseptischen Kautelen) gestalten, wurde nicht untersucht.

VI. Sensibilisierung.

Von den chemischen Wirkungen des Lichtes ist seit längerer Zeit bekannt, daß sie durch Zusatz gewisser Stoffe erhöht werden können. Dies erklärt sich entweder dadurch, daß die zugesetzten Substanzen durch ihr Absorptionsvermögen für die wirksamen Strahlen als Überträger der Lichtenergie wirken (optische Sensibilisation), oder dadurch, daß die zugesetzten Stoffe einige von den gebildeten Produkten neutralisieren und somit die Reaktionsgeschwindigkeit erhöhen (chemische Sensibilisation).

H. v. Tappeiner und seine Schüler[5])[9]) (Raab, Jacobson) haben zuerst gefunden, daß die Wirkung des Lichtes auf niedere Organismen bei Zusatz gewisser fluoreszierender Stoffe beträchtlich vermehrt wird. Dreyer[10]) hat gezeigt, daß Mikroorganismen durch Sensibilisierung empfindlich für sonst unwirksame Spektralabschnitte gemacht werden können.

Ich habe deswegen versucht, durch Zusatz fluoreszierender Substanzen eine Chymosinlösung für die sichtbaren Strahlen empfindlich zu machen.

Versuch XXXIV. 21. Juli 1903.

Labextrakt $^{1}/_{10}$ mit Erythrosin (Tetrajodfluoreszeinnatrium) — blaues Eosin — bis zu kräftiger Fluoreszenz versetzt, wurde in der 3,2 mm-Quarzkammer 30 Min. lang dem durch Glasfilter filtrierten konzentrierten Lichte exponiert, ohne daß eine Wirkung erkennbar wurde; die Koagulationszeit für die belichtete Probe betrug $4^{1}/_{4}$ Min., für die unbelichtete $4^{1}/_{4}$ Min.

Ich fühlte mich nicht veranlaßt, weitere Versuche in dieser Richtung anzustellen.

Später haben v. Tappeiner[5]) und Stark[11]) sehr interessante Versuche über die Wirkung von fluoreszierenden Stoffen auf Enzyme veröffentlicht.

v. Tappeiner zeigte, daß Eosin, Magdalarot, Chinolinrot die Lösungen von Diastase, Invertin, Papayotin im Tageslichte recht kräftig beinflussen.

Soweit aus den Mitteilungen ersichtlich ist, sind die Versuche in Glasgefäßen ausgeführt, und es ist somit gezeigt, daß die sonst schwach wirkenden Teile des Spektrums mit Beihilfe von Sensibilisatoren die Enzyme angreifen können. Wenn das Licht zuerst ein Filter mit der betreffenden fluoreszierenden Lösung passieren mußte, blieb es ohne Einwirkung.

Nicht fluoreszierende Stoffe mit ähnlichen Absorptionsverhältnissen (Fuchsin, Azofuchsin usw.) ließen sich nicht als Sensibilisatoren verwenden. Stark hat namentlich das Verhalten der Diastase Sensibilisatoren gegenüber näher studiert. Die beiden Forscher haben bei den von ihnen getroffenen Anordnungen gefunden, daß das Tageslicht ohne Einfluß auf reine Enzymlösungen ist.

VII. Wirkung auf das Chymosinogen.

Es war natürlich auch von Interesse zu erfahren, wie das Chymosinogen — das Proenzym des Chymosins — sich dem Licht gegenüber verhält. Dies ließ sich leicht ausführen, da sich das Chymosinogen durch schwache Kochsalzlösung aus der Schleimhaut des Kalbsmagens in reichlicher Menge erhalten läßt. Der Auszug enthält gewiß auch kleine Chymosinmengen; doch können diese den großen Chymosinmengen gegenüber, die mittelst gelinder Säurewirkung aus dem Proenzyme freigemacht werden können, ganz vernachlässigt werden.

Bei diesen Versuchen kann man die Lösungen nicht einmal annähernd von derselben Konzentration darstellen, weshalb sie einzeln besprochen werden müssen.

Die Versuchsanordnung war die folgende:

Ein frischer Kalbsmagen wurde zerrieben und mit der fünffachen Menge 3proz. Kochsalzlösung ein Paar Stunden extrahiert, die Lösung

über Nacht auf Eis filtriert. Sie wurde dann mit einigen Volumen Wasser verdünnt, filtriert und für die Versuche verwendet. Die Untersuchung wurde für unbelichtete wie belichtete Proben in zwei Abschnitten vorgenommen. Zuerst wurde die Menge des vorgebildeten Chymosins in der gewöhnlichen Weise mit 0,1 ccm zu 10 ccm Ziegenmilch bestimmt. Dann wurde das Proenzym durch Zusatz des gleichen Volumens n/10-Salzsäure und halbstündiges Erhitzen auf 37° aktiviert. Die für die letzteren Lösungen gefundenen Koagulationszeiten sind das Maß für das ursprüngliche Plus des freigemachten Chymosins; da das letztere indessen weitaus überwiegt, so könnnen die gefundenen Zahlen ohne weiteres auch als Maß für den Gehalt an Chymosinogen dienen. Da alle Zahlen nur einen relativen Wert besitzen, habe ich nicht weiter berücksichtigt, daß sämtliche zu den Koagulationsversuchen verwendeten Lösungen nur halb so konzentriert waren, als bei der Belichtung.

Versuch XXXV. 22. Juli 1903. Einfluß der Belichtungsdauer.

Die Belichtung geschah in der 3,2 mm-Quarzkammer mit dem konzentrierten Licht einer 50 Ampère-Lampe. Die Resultate sind in Tabelle V zusammengestellt.

Tabelle V.

Belichtet in	Die Koagulationszeit: Direkt (Chymosin)	Nach Aktivierung (Chymosinogen)
0	150 Min.	$9^1/_2$ Min.
5 Min.	unbestimmbar	28 „
10 „	„	68 „
15 „	„	mehr als 150 „
30 „	„	„ „ 600 „

Man sieht, daß auch das Proenzym mit der Dauer der Belichtung in steigendem Maße zerstört wird. Eine Belichtung von 5 Min. hat 77 Proz. der Proenzymmenge unwirksam gemacht.

Versuch XXXIII. 17. Juli 1903.
Wirkung der verschiedenen Spektralabschnitte.
Die gewonnenen Resultate sind in Tabelle VI zusammengestellt.

Tabelle VI.

Filter:	Die Belichtungszeit:	Die Koagulationszeit direkt (Chymosin)	Nach Aktivierung (Chymosinogen)
Keines	0	27 Min.	3 Min.
Glasfilter mit Wasser	30 Min.	32 „	c. $3^1/_2$ „
Glasfilter mit Fuchsin	„ „	27 „	c. 3 „
Glasfilter mit K_2CrO_4	„ „	$28^1/_2$ „	c. 3 „
Keines	„ „	24 „	c. 45 „

Es stellt sich somit heraus, daß eine sichere Wirkung nur eintritt, wenn die ultravioletten Strahlen wirken können, was weiter auch aus den Versuchen XXXVb, XXV und XXVII ersichtlich ist.

Versuch XXXVb (dieselbe Lösung wie in Versuch XXXV).

Vor die Versuchskammer wurde ein Glasfilter mit Wasser eingeschaltet. Nach Aktivierung entsprach die Menge des Proenzyms für die 30 Min. belichtete Probe einer Koagulationszeit von 9¼ Min. Für die Kontrollprobe fand sich 9½ Min.

Versuch XXV. 10. Juli 1903.

Chymosinogenlösung (Kalbsmagenextrakt) wird 1 Stunde lang hinter einem Glasfilter mit 5proz. K_2CrO_4-Lösung dem konzentrierten Lichte ausgesetzt. Die Koagulationszeit betrug für die unbelichtete Probe 30½ Min. vor und 5 Min. nach Aktivierung; für die belichtete Probe 33½, bzw. 5 bis 5½ Min.

Eine aktivierende Wirkung des am wenigsten brechbaren Teils des Spektrums, wie sie Green für das Proenzym der Diastase gesehen hat, habe ich nicht beobachtet. Leider habe ich nicht dieselbe Versuchsanordnung wie Green anwenden können; namentlich ist das von mir verwendete Licht mehrere hundert Mal stärker gewesen, und die Ursache davon, daß das Chymosinogen sich anders als das Diastasezymogen verhielt, kann eventuell hierin gesucht werden.

Auch schwache Lichtquellen, wie das diffuse elektrische Bogenlicht und das Sonnenlicht haben eine zerstörende Wirkung, wenn die Belichtung in Quarzzellen vorgenommen wird.

Versuch XXXIX. 23. Juli 1903.

Ein frisch bereitetes Kalbsmagenextrakt wurde in 45 cm Abstand von einer 30 Ampère-Lampe belichtet. Nach Aktivierung betrug die Koagulationszeit

nach 15 Min. Belichtung 11½ bis 11¾ Min.
„ 40 „ „ 13½ Min.
Für die unbelichtete Kontrollprobe 9½ „

Versuch XXXVIII. 22. Juli 1903.

Kalbsmagenextrakt wurde in einer 1,5 mm-Quarzkammer dem direkten Sonnenlichte ausgesetzt. Für die unbelichtete Probe betrug die Koagulationszeit 11 Min. vor und 1½ Min. nach Aktivierung; für die 3 Stunden belichtete Probe 11 Min. bzw. 1¾ Min.

Versuch XLVIII. 26. und 27. Juli 1903.

Kalbsmagenextrakt in zwei verschiedenen Verdünnungen (a und b). Die Belichtung fand im strahlenden Sonnenschein in einer 1,5 mm-Quarzkammer statt. Die Koagulationszeit betrug:

		Direkt:	Nach Aktivierung:
a)	Unbelichtete Probe:	23 $^{1}/_{2}$ Min.	2 $^{1}/_{2}$ Min.
	Nach 3 Stunden Sonnenlicht:	26 $^{1}/_{2}$ „	2 $^{1}/_{2}$ bis 2 $^{3}/_{4}$ Min.
b)	Unbelichtete Probe:	66 „	5 $^{1}/_{4}$ Min.
	Nach 1 Stunde Sonnenlicht:	67 „	5 $^{1}/_{4}$ „

Nach diesen Versuchen mit schwachen Lichtquellen scheint es, daß hier ebenso wenig wie bei den Versuchen mit konzentriertem Lichte von einer günstigen Einwirkung — von einer Aktivierung die Rede sein kann.

VIII. Wirkung auf das Antichymosin.

Wie Hammarsten und Rödén[13]) zuerst, später Fuld und Spiro[14]) zeigten, besitzt das normale Blutserum die Fähigkeit, die Wirkungen verschiedener Enzymlösungen aufzuheben oder zu neutralisieren. Diese Eigenschaften werden auf gewisse Körper — Antienzyme — zurückgeführt.

Rödén, Fuld und Spiro haben ihre Versuche so ausgeführt, daß zu einer bestimmten Milchmenge wechselnde Mengen Serum und Chymosinlösung hinzugefügt wurden. Durch eine hinreichend große Anzahl von Proben war es möglich zu ermitteln, wie viel Serum notwendig war, um die Koagulation zu verhindern. Hierdurch erhielt man jedoch keine nähere Kenntnis davon, wie Enzym und Antienzym einander gegenseitig beeinflussen, da das Chymosin sofort die Milch angreift.

Die Serummengen, die ich ohne große Mühe durchleuchten konnte, erlaubten nicht, das von diesen Forschern angegebene Verfahren zu befolgen.

Ich ließ gleiche Volumina von den Enzym- und Antienzym-Lösungen direkt aufeinander reagieren. Nach bestimmter Zeit wurde die Menge des noch wirksamen Enzyms in der gewöhnlichen Weise durch die Koagulationszeit mit 0,1 ccm gegen 10 ccm Ziegenmilch bestimmt. Ich brauche nicht anzuführen, daß ich Kontrollversuche anstellte.

Wie Spiro und Fuld[14]) zeigten, enthält das Serum selbst gewiß auch Chymosin. Der Gehalt ist indessen so unbedeutend, daß er bei den kleinen Mengen (0,05 ccm), die zu jedem Koagulationsversuche verwendet wurden, ganz außer Betracht bleiben konnte.

Versuch XX. 5. Juli 1903.

Hierzu wurde ein steriles Kalbsblutserum unverdünnt in der 3,2 mm-Quarzkammer 30 Min. lang belichtet und nachher mit dem gleichen Volumen $^{1}/_{10}$ Labextrakt versetzt.

Nach 100 Min. ergab die Mischung bei Ziegenmilch eine Koagulationszeit von 7 . Min., bei Kuhmilch eine solche von 17 Min. Eine Parallelprobe (gleiche Volumina unbelichtetes Serum und $^{1}/_{10}$ Labextrakt) zeigte

nach 100 Min. eine Koagulationszeit von 13,5 bzw. 27, die Kontrollprobe mit $^1/_{20}$ Labextrakt $3^1/_2$ bzw. $8^1/_2$ Min. Somit hat eine Belichtung des Kalbsblutserums das Antichymosin um fast 60 Proz. abgeschwächt.

Versuch XLIV. 24. Juli 1903.

Dasselbe Kalbsblutserum wie im vorigen Versuche wurde in einer 3,2 mm-Quarzkammer 30 und 60 Min. belichtet und nachher mit dem gleichen Volumen $^1/_{10}$ Labextrakt versetzt. Die Koagulationswirkung der Mischung wurde nach 100 und 200 Min. gegen Ziegenmilch bestimmt.

Serum	Chymosinlösung	Koagulationszeit nach 100 Min.	Koagulationszeit nach 200 Min.
1 Vol. unbelichtet	1 Vol. $^1/_{10}$ Labextrakt	$9^1/_4$ Min.	18 Min.
1 Vol. belichtet durch 30 Min.	„ „ „ „	$7^1/_2$ „	11 „
1 „ „ „ 60 „	„ „ „ „	$6^3/_4$ „	11 „
—	$^1/_{20}$ Labextrakt	$3^1/_4$ „	$3^1/_2$ „

Während das unbelichtete Serum die Koagulationszeit der Chymosinlösung von $3^1/_4$ auf $9^1/_4$ und 18, d. h. um 6 und 15 Min. erhöht hat, beträgt die Steigerung für die belichtete Probe 4 und $7^1/_2$ Min., oder anders ausgedrückt, das Antichymosin ist um 40 Proz. abgeschwächt.

Versuch L. 29. Juli 1903.

Von einem Pferdeblutserum, das ich Hrn. Direktor Dr. Thorwald Madsen verdanke, wurden Proben teils direkt (A), teils nach Verdünnung auf $^1/_2$ (B) und $^1/_4$ (C) belichtet und dann mit $^1/_{10}$ Labextrakt versetzt.

Für die Mischung mit A wurde die Koagulationszeit nach 3 Stunden, für B und C nach 14 Stunden und zwar gegen Ziegenmilch bestimmt.

A.

Pferdeblutserum $^1/_1$	Chymosinlösung	Koagulationszeit nach 3 Stunden
1 Vol. unbelichtet	1 Vol. $^1/_{10}$	16 Min.
1 Vol. belichtet durch 30 Min.	„ „ „	$9^1/_2$ „
„ „ „ „ 60 „	„ „ „	$8^1/_2$ „
—	$^1/_{20}$	$2^1/_2$—3 „

Die Abschwächung des Antichymosins steigt mit der Dauer der Belichtung, so daß in 30 Min. 50 Proz, in 60 Min. 62 Proz. zerstört wurden.

B.

Pferdeblutserum $^1/_2$	Chymosinlösung	Koagulationszeit nach 14 Stunden
1 Vol. unbelichtet	1 Vol. $^1/_{10}$	28 Min.
1 Vol. belichtet durch 15 Min.	„ „ „	21 „
„ „ „ „ 30 „	„ „ „	28 „
„ „ „ „ 60 „	„ „ „	14 „
—	$^1/_{20}$	$2^1/_2$—3 „

C.

Pferdeblutserum $^1/_4$	Chymosinlösung	Koagulationszeit nach 14 Stunden
1 Vol. unbelichtet	1 Vol. $^1/_{10}$	18 Min.
1 Vol. belichtet durch 15 Min.	„ „ „	39 „
„ „ „ „ 30 „	„ „ „	10 „
„ „ „ „ 60 „	„ „ „	16 „
—	$^1/_{20}$	$2^1/_2$—3 „

Wie man sieht, wechseln die Resultate sehr. Das konzentrierte Licht hat die Menge des Chymosins einmal vermindert, ein andermal vermehrt. Diese Versuche ermöglichen kein Urteil über die Frage, inwieweit die Menge des Antichymosins durch physikalische Mittel (hier Licht) vermehrt werden kann. Ich habe trotzdem diese Versuche mitgeteilt, da ich nicht weiß, ob ich auf diese Frage noch einmal zurückkommen und in Angriff genommene Versuche, die sich in derselben Richtung bewegen, fortsetzen kann.

Über das Verhalten der Proenzyme den Antikörpern des Blutserums gegenüber liegen, soweit mir bekannt, keine Untersuchungen vor.

Ich habe vereinzelte Versuche in dieser Richtung vorgenommen, indem ich Kalbsblutserum einige Stunden auf ein Kalbsmagenextrakt wirken ließ.

Mit einer Ausnahme habe ich keine Abschwächung konstatieren können. In dem einen Falle hatte das unbelichtete wie das 30 Min. belichtete Serum die Chymosinogenmenge soweit verändert, daß sich nach Aktivierung die Koagulationszeit statt zu 11 zu 20 und 21 Min. ergab. (Versuch XXXVI. 22. Juli 1903.)

Die Beurteilung dieses Verhaltens wird natürlich durch die Säurespaltung kompliziert, die notwendig ist, um das Chymosinogen in Chymosin überzuführen. Dadurch kann eine zwischen dem Proenzym und Antienzym eingetretene Vereinigung gelöst werden; in diesem Falle könnten die Massenverhältnisse zwischen Säure und absoluter Enzymmenge die Prozesse in verschiedenen Richtungen beeinflussen, was vielleicht die entgegengesetzten Resultate zu erklären vermag.

Durch die voranstehenden Untersuchungen ist gezeigt, daß sowohl Chymosin, Chymosinogen wie die Antikörper des Blutserums vom konzentrierten elektrischen Licht leicht beeinflußt werden.

Wenn es gelingt eine starke Lichtquelle mit einer konstanten Menge von ultravioletten Strahlen zu erhalten, so wird man darin ein neues Hilfsmittel besitzen, um die Enzyme, Proenzyme und Antienzyme für sich sowie in ihrem gegenseitigen Verhalten näher zu studieren. —

Literaturverzeichnis.

1) Downes, A. and T. P. Blunt, On the influence of light upon protoplasm. Proceedings of the Royal Society, London. Vol. **28**, 1879, p. 205 seq.

2) Fermi, Claudio und Leone Pernossi, Über die Enzyme. Zeitschrift f. Hygiene und Infektionskrankheiten **18**, 86 bis 92, 1894.

3) Emmerling, O., Die Einwirkung des Sonnenlichtes auf die Enzyme. Berichte d. deutsch. chem. Gesellschaft **34**, 3, 3811 bis 3814, 1901.

4) Weiss, Fr., Studier over proteolytiske Enzymer i spirende byg (Malt). Meddelelser fra Carlsberglaboratoriet. V. Bind, 3de hefte, S. 239 bis 241 (1903).

5) v. Tappeiner, H., Über die Wirkung fluoreszierender Substanzen auf Fermente und Toxine. Berichte d. d. chem. Gesellschaft **36**, 3035 u. f., 1903.

6) Reynolds Green, J., On the action of light on diastase, and its biological significance. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Vol. **188**, 167 bis 190 (1897).

7) Brown and Morris, A contribution to the chemistry and physiology of foliage leaves. Journal chem. Society 1893.

8) Snow, Benjamin W., On the infrared spectra of the alkalies. The physical Review. Vol. **1**, 1894, Pl. I.

9) Jacobson, R., Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Flimmerepithel. Zeitschr. f. Biologie **41**, 1901. — Raab, Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. Zeitschr. f. Biologie **39**, 1900. — Derselbe, Weitere Untersuchungen über die Wirkung fluoreszierender Stoffe. Zeitschr. f. Biologie **44**, 1902.

10) Dreyer, Georges, Sensibilisering af mikroorganismer og dyriske väv. Meddelelser fra Finsens Lysinstitut **7**, 110 bis 125.

11) Stark, Edmund, Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Diastase. Inauguraldissertation München 1903.

12) Bunsen und Roscoe, cfr. Jahresberichte über die Fortschritte d. Chemie etc. (Kopp u. Will) 1857, S. 41 bis 50.

13) Rödén, Helge, Om blodserums inverkan paa mjölkens coagulation med löpe. Upsala Läkareförenings Förhandlingar **22**, 546 (1886 bis 87). Außerdem Hammarstens Referat in Malys Jahresbericht **17**, 160.

14) Fuld, E. und K. Spiro, Über die labende und labhemmende Wirkung des Blutes. Hoppe Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie **31**, 132, 1900.

XXII.

Beobachtungen über das Vorkommen von Ätherschwefelsäuren, von Taurin und Glycin bei niederen Tieren.

Von Dr. phil. **Agnes Kelly.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

I. Vorkommen von Ätherschwefelsäuren in den Gerüstsubstanzen wirbelloser Tiere.

Der von Schmiedeberg*) geführte Nachweis, daß die Knorpelsubstanz Chondroitinschwefelsäure enthält, läßt vermuten, daß auch die knorpelähnlichen Gerüstsubstanzen wirbelloser Tiere die gleiche oder eine ähnliche Ätherschwefelsäure enthalten.

Krukenberg**) hat seinerzeit in den mit Wasser und Pepsinsalzsäure gereinigten Spirographisröhren 7,08 bis 7,85 Proz. Schwefel gefunden. v. Fürth***) bemerkt bei Anführung dieser Befunde, daß es nahe läge, dabei an eine gepaarte Schwefelsäure nach Art der Chondroitinschwefelsäure zu denken. Eine Sendung von Spirographisröhren, die ich der gütigen Vermittlung des Herrn Prof. Cori, Direktors der zoologischen Station in Triest, verdanke, gab mir Gelegenheit die Richtigkeit dieser Vermutung zu prüfen.

Die Röhren wurden mit heißem Wasser von Schlamm befreit, dann anhaltend mit 2proz. Salzsäure bis zum völligen Verschwinden der Sulfat- und Chlorid-Reaktion in der Waschflüssigkeit gewaschen. Die getrockneten Röhren enthielten 0,62 Proz. Asche, die hauptsächlich aus feinem, rotem, in Salzsäure unlöslichem Sand bestand.

*) Schmiedeberg, Über die chemische Zusammensetzung des Knorpels. Archiv f. exp. Path. u. Pharm. 28, 1891.

**) Krukenberg, Über die Hyaline. Verhandlungen der physik.-mediz. Gesellschaft zu Würzburg. N. F. 18, 1883, Nr. 3.

***) v. Fürth, Vergleichende chemische Physiologie der niederen Tiere. Jena 1903. S. 460.

Der Gesamtschwefel wurde mit Natriumsuperoxyd und Soda zu 6,14 Proz. für die aschefreie Substanz gefunden. Die Röhrensubstanz enthielt keinen „bleischwärzenden Schwefel", gab aber bei längerem Kochen mit Salzsäure eine Lösung, die mit Baryumchlorid gefällt wurde. Um den Gehalt an der diesem Verhalten zufolge vorliegenden Ätherschwefelsäure zu bestimmen, wurde die Substanz einige Stunden lang mit 20proz. Salzsäure gekocht, wobei sie bis auf geringe braune Reste in Lösung ging. Die Lösung wurde filtriert, mit reiner Natronlauge neutralisiert und zur Bestimmung der Schwefelsäure verwendet. Es fanden sich in dieser Form 4,19 Proz. Schwefel.

Versuche, die Verbindung zu isolieren, die die Ätherschwefelsäure enthielt, hatten geringen Erfolg. Die Röhren lösten sich in 2proz. Kalilauge bei Zimmertemperatur, bei Salzsäurezusatz fiel aus der Lösung ein Niederschlag, der den größeren Teil des Schwefels enthielt. Er wurde gut ausgewaschen und neuerdings in Kalilauge gelöst. Die Flüssigkeit wurde mit Kupfersulfat versetzt, wobei schöne Biuretfärbung erhalten wurde, dann mit Alkohol gefällt und dieses Vorgehen wiederholt, bis die Biuretreaktion nur noch ganz schwach auftrat. Dann wurde die Substanz mit Salzsäure bis zur Entfernung des Kupfers und mit Wasser bis zur Beseitigung der Salzsäure gewaschen. Das so erhaltene Präparat gab stark die Xanthoproteinreaktion und die Probe nach Molisch, schwach die Millonsche Reaktion; die Schwefelbleiprobe fehlte. Es enthielt 0,59 Proz. Asche, 4,63 Proz. Schwefel, und zwar 2,80 Proz. in Form von Ätherschwefelsäure (Mittel von zwei Bestimmungen), 46,87 Proz. Kohlenstoff, 5,63 Proz. Wasserstoff, 13,26 Proz. Stickstoff.

Das Vorkommen von Ätherschwefelsäuren ist ferner von Lindemann*) für die Haut der Holothurien angegeben worden. Aus der Haut von Stichopus regalis erhielt er eine Substanz, die beim Zerkochen mit Salzsäure einen reduzierenden Körper und Schwefelsäure abspaltete.

Ein kurzer Aufenthalt an der Marine Biological Station in Plymouth bot mir Gelegenheit, eine Anzahl von Gerüstsubstanzen und sonstigen Geweben von Wirbellosen auf die Anwesenheit von Ätherschwefelsäuren zu prüfen.

Ich ging so vor, daß ich die Gewebe erst gründlich mit destilliertem Wasser auswusch, dann so oft mit stets erneuten Mengen von 10proz. Salzsäure einige Augenblicke kochte, bis sie keine Schwefelsäure mehr

*) Lindemann, Über einige Eigenschaften der Holothurien. Zeitschr. f. Biol. 39, 1899.



abgaben. Dabei zerfielen die Gewebe nicht, so daß anzunehmen war, daß die ausgewaschene Schwefelsäure anorganischer Natur war. Erst jetzt wurden die untersuchten Gewebe mit konzentrierter Salzsäure so lange erhitzt, bis sie gänzlich gelöst oder zerfallen waren. Gab die Lösung jetzt einen Sulfatniederschlag mit Baryumchlorid, so wurde dies als ein Hinweis auf die Gegenwart von Ätherschwefelsäuren angesehen, der insofern als ein Nachweis angesehen werden darf, als es wenig wahrscheinlich ist, daß sich merkliche Mengen anorganischer Schwefelsäure der Extraktion mit kochender verdünnter Salzsäure entzogen haben. Fehlte Schwefelsäure nach der Behandlung mit siedender konzentrierter Salzsäure, so wurde auf Abwesenheit von Ätherschwefelsäure geschlossen.

So konnte gezeigt werden, daß in dem Stützgerüst von Tubularia und Sertularella unter den Hydroiden, bei Alcyonium, bei Cellaria, einem Bryozoen, und in dem Byssus von Mytilus edulis keine Ätherschwefelsäuren vorhanden sind. Auch der Kopfknorpel einer Sepie wurde untersucht. Obgleich mir nur Knorpel von einem Exemplar zur Verfügung stand, so reichte die Menge doch, um die Abwesenheit von Ätherschwefelsäure sicherzustellen.

Hingegen erhielt ich positive Resultate bei Echinodermen, anscheinend am ausgesprochensten mit der Haut von Stichopus regalis.

Die Haut wurde zerkleinert und andauernd mit Ammonchlorid geschüttelt, wobei einerseits eine opaleszente Lösung, andererseits ein Rückstand von knorpelartiger Beschaffenheit erhalten wurde. Dieser Rückstand wurde nach dem Auswaschen getrocknet und analysiert. Er enthielt 0,73 Proz. Asche, 48,31 Proz. C, 6,54 Proz. H, 17,72 Proz. N, 1,50 Proz. S. Von dem Gesamtschwefel entfiel der größte Teil (gefunden 1,20 Proz.) auf Ätherschwefelsäure. Die Substanz gab alle allgemeinen Eiweißreaktionen, aber im Gegensatz zu Lindemanns Angaben reduzierte sie nach andauerndem Kochen mit Salzsäure Fehlingsche Lösung nicht, höchstens kam es beim Stehen zu einer sehr geringen Ausscheidung von Kupferoxydul.

Bei den Asteroideen war die Reaktion auf Ätherschwefelsäuren weit weniger ausgesprochen. Die entkalkten Stücke des Hautskeletts gaben nach Kochen mit Salzsäure kaum mehr als Spuren von Baryumsulfat.

Bei Palmipes, wo unter den untersuchten Asteriodeen die größte Menge von Ätherschwefelsäure gefunden wurde, waren vom Schwefel nur 0,6 Proz. in dieser Form vorhanden. Asterias rubens enthielt etwa ebensoviel, Asterias glacialis und Solaster etwas weniger; bei Asterina fanden sich nur Spuren. Auch bei den Ophiuriden fand ich nur Spuren, bei Ophiura aliaris etwas deutlichere als bei Ophiothrix fragilis oder Ophioploeus imbricatus.

II. Über das Vorkommen von Taurin und Glykokoll bei Pecten opercularis und Mytilus edulis.

Das Vorkommen von Taurin und Glykokoll bei Mollusken findet sich mehrfach verzeichnet, doch ist nur in einem Teil der Beobachtungen ein sicherer chemischer Beweis erbracht. So findet sich Taurin nach Karsten*) in der Leber von Mytilus, nach Krukenberg**) in der Leber verschiedener Gastropoden, Mytilus und Ostraea, in den Muskeln einiger Lamellibranchier und nach Lettelier***) in dem Bojanusschen Organ von Mytilus. Doch ist in keinem dieser Fälle ein sicherer Beweis erbracht.

Valenciennes und Frémy†) fanden Taurin in den Muskeln der Auster und identifizierten es durch Kristallform und Analyse.

Glykokoll wurde von Chittenden††) in dem Schließmuskel von Pecten irradians gefunden, und durch Analyse, Schmelzpunkt, Darstellung von Salzen identifiziert. Der Gehalt an Glykokoll wurde zu 0,39 bis 0,71 Proz. ermittelt.

Während eines Aufenthaltes in dem Laboratorium der Marine Biological Association in Plymouth sammelte ich eine genügende Menge von Schließmuskeln und Bojanusschen Organen von Pecten opercularis und Mytilus edulis. Die Untersuchung wurde später in Straßburg ausgeführt.

Die Muskeln und Bojanusschen Organe waren dem lebenden Tiere entnommen und in Alkohol aufbewahrt. Bei der Verarbeitung wurde der Alkokol verdampft und der Rückstand zugleich mit den alkoholgehärteten Muskeln und Organen zunächst mit Wasser ausgezogen.

Taurin. Die wässerigen Auszüge der Muskeln und der Bojanusschen Organe von Pecten und Mytilus enthielten sehr reichlich Schwefel in organischer Bindung.

*) Karsten, Disquisitio microscopica et chemica hepatis et bilis Crustaceorum et Molluscorum. Nova acta Acad. Leopold.-Carolinae. Serie 21, 1845.

**) Krukenberg, Beiträge zur Kenntnis der Verbreitung des Harnstoffs und der Amidosäuren bei Wirbellosen. Vergl. Studien 1. Reihe, 2. Abt. 1880. — Untersuchungen des Fleischextraktes verschiedener Fische und Wirbellosen. Unters. d. physiol. Instituts z. Heidelberg 4, Heft 1, 1881. — Physiol.-chem. Untersuchungen. Vergl. Studien 1. Reihe, 4. Abt. 1881, S. 62 Anmerkung.

***) Letellier, Etude de la fonction urinaire chez les Mollusques acéphales. Arch. de Zool. exper. [2] 5, 1887.

†) Valenciennes et Frémy, Recherches sur la composition des muscles dans la série animale. C. R. 41, 1885, p. 739—741. — Recherches sur la composition des oeufs et des muscles dans la série animale. Ann. des sciences nat. [3] 50, 145—177, 1857.

††) Chittenden, Über Glykogen und Glykokoll im Muskelgewebe von Pecten irradians. Ann. d. Chem. u. Pharm. 178, 266, 1875.

10 g Mytilusmuskeln (bei 110° getrocknet) wurden wiederholt mit kochendem Wasser ausgezogen, die Extrakte vereinigt und auf ein Liter gebracht. In je 400 ccm wurde der Sulfat-Schwefel und der Gesamtschwefel bestimmt. Es ergab sich, daß die trockenen Muskeln 0,3 Proz. anorganischen und 1,28 Proz. organischen, in Wasser löslichen Schwefel enthielten, was einem Gehalt von etwa 5 Proz. Taurin entspricht. Ebenso enthielten die Muskeln von Pecten opercularis 1,24 Proz. organischen Schwefel, entsprechend 4,84 Proz. Taurin, während die Bojanusschen Organe von Mytilus 0,50 Proz. organischen Schwefel, entsprechend 1,95 Proz. Taurin, ergaben.

Obgleich danach eine große Ausbeute an Taurin erwartet werden konnte, war es nicht besonders leicht, es aus den wässerigen Auszügen der Muskeln oder der Bojanusschen Organe zum Kristallisieren zu bringen.

Etwa 600 g fein zerkleinerte, in Alkohol gehärtete Muskeln von Mytilus, entsprechend etwa 200 g Trockensubstanz, wurden mit siedendem Wasser ausgezogen; das Extrakt wurde mit Bleiessig ausgefällt, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff von überschüssigem Blei befreit, zum dicken Sirup eingeengt und mit salzsäurehaltigem Alkohol behandelt. Beim Stehen schieden sich an Wand und Boden des Gefäßes Kristalle aus, die nach dem Umkristallisieren aus Wasser in Form und Löslichkeitsverhältnissen mit Taurin übereinstimmten. Sie verbrannten unter Entwicklung schwefliger Säure, dann eines Geruches nach verbranntem Horn und enthielten 25,3 Proz. Schwefel. (Berechnet für Taurin 25,6 Proz.) Die Ausbeute betrug nur 1,5 g aus 200 g trockener Muskelsubstanz (statt der erwarteten 5 g).

Eine bessere Ausbeute wurde erhalten, wenn das Extrakt erst mit Phosphorwolframsäure ausgefällt, der Überschuß der Säure mit Bleiessig entfernt und im Filtrat das Blei mit Schwefelwasserstoff ausgefällt wurde. Dieses Verfahren wurde auch bei den späteren Versuchen, Taurin nachzuweisen, eingehalten.

Die erste Kristallisation aus den Muskeln von Pecten war viel reiner als sie bei Mytilus erhalten wurde. Die Schwefelbestimmung ergab 25,79 Proz. Die Ausbeute an Taurin betrug hier mehr als 1 Proz. Die Taurinausbeute aus den Bojanusschen Organen von Mytilus betrug nahe an 1 Proz. Die Schwefelbestimmung des isolierten Taurins ergab 25,87 Proz. Auch die Bojanusschen Organe von Pecten enthielten reichlich organischen Schwefel, doch reichte das Material nicht für eine weitere Untersuchung.

Die erhebliche Menge Taurin, die sich in den Muskeln und den Bojanusschen Organen von Mytilus findet, führten auf den Gedanken, daß das Taurin ein direktes Spaltungsprodukt der Mytilus-Eiweißkörper sein könnte.

Es wurde darum eine Quantität der vorher mit Wasser erschöpften Bojanusschen Organe einige Stunden mit konzentrierter Salzsäure gekocht. Nach Ausfällung mit Phosphorwolframsäure und Entfernung des Überschusses der Säure mit Hilfe von Bleiessig wurde die entbleite Flüssigkeit mit Alkohol behandelt, wobei Leucin und Tyrosin erhalten wurden. Nach deren Abtrennung wurde mit Quecksilberacetat unter wiederholtem Neutralisieren mit Natriumkarbonat ausgefällt, wobei Taurin in den Niederschlag eingeht. Die erhaltene Fällung wurde nach dem Auswaschen mit Schwefelwasserstoff zerlegt; aus dem zum Sirup eingeengten Filtrat, das viel organischen Schwefel enthielt, schieden sich neben Kochsalz Kristalle von dem Aussehen und den Löslichkeitsverhältnissen des Taurins aus. Doch reichte die Menge nicht zur Analyse.

Glykokoll. Die Verwandtschaft mit Pecten irradians ließ erwarten, daß sich auch in Pecten opercularis reichlich Glykokoll finden dürfte. In der Tat konnte es darin auf zweierlei Art nachgewiesen werden.

1. Der salzsäurehaltige Alkohol, aus dem sich Taurin abgeschieden hatte, wurde eingedunstet und der Rückstand durch Schütteln mit Benzoylchlorid in alkalischer Lösung benzoyliert. Die alkalische Flüssigkeit wurde mit Salzsäure gefällt, die ausgeschiedene Benzoesäure durch Extraktion mit Petroläther im Soxhlet-Apparat entfernt und die zurückgebliebene Hippursäure durch oftmaliges Umkristallieren gereinigt. Sie schmolz bei 182° (unkorr., anstatt bei 188,5°). Aus ihr wurde das Lactimid der Benzoylamidozimtsäure nach den Angaben von Spiro*) dargestellt. Es wurden die typischen Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 163°. (unkorr., statt 165°) erhalten.

2. Das mit salzsaurem Alkohol erhaltene Extrakt wurde zum dicken Sirup eingedunstet, mit Kupferoxydhydrat gekocht, das dunkelblaue Filtrat mit Alkohol zur Kristallisation gebracht und das ausgeschiedene unreine Kupfersalz wiederholt aus Wasser umkristallisiert. Es enthielt schließlich 29,69 Proz. Cu (berechnet für Glykokollkupfer 29.86 Proz.). Auch entsprachen die erhaltenen Kristalle in Aussehen, Löslichkeit und Verhalten beim Verbrennen durchaus dem Glycinkupfer.

Der Gehalt an Glykokoll ist hier ebenso hoch oder noch höher als Chittenden für Pecten irradians (0,39 bis 0,71 Proz.) gefunden hat. Allerdings konnte aus 150 g trockener Muskeln nur

*) Über Nachweis und Vorkommen des Glykokolls. Zeitschr. f. physiol. Chemie 28, 174, 1899.

ungefähr 1 g reines Kupfersalz erhalten werden, was nur 0,47 Proz. Glykokoll entspräche. Allein der erste unreine Glycinkupferniederschlag betrug an 5 g, was auf einen viel höheren Gehalt hinweist.

In den Muskeln und den Bojanusschen Organen von Mytilus konnte Glykokoll weder mit dem einen noch mit dem anderen bei Pecten erfolgreich angewandten Verfahren aufgefunden werden. Die Bojanusschen Organe enthielten eine erhebliche Menge gärungsfähigen Zuckers.

XXIII.

Über das Vorkommen von Amide spaltenden Enzymen bei Pilzen.

Von Dr. **K. Shibata.**

Die Abspaltung von Ammoniak im pflanzlichen Stoffwechsel ist ein wichtiger und weitverbreiteter biochemischer Prozeß. Daß Ammoniak durch die Tätigkeit niederer Pilze aus verschiedenen Stickstoffverbindungen abgespalten wird, ist eine alte Beobachtung. W. Butkewitsch*) hat in neuerer Zeit diese Ammoniakbildung aus Protein und Aminosäuren näher verfolgt, hat aber keinen Schluß gezogen, ob diesem Prozeß eine oxydative oder enzymatische Tätigkeit zugrunde liegt, was zu unterscheiden von Wichtigkeit wäre. Auch die höher organisierten Pflanzen enthalten häufig sehr kleine Mengen Ammoniak in verschiedenen Teilen der Vegetationsorgane.

Bekanntlich kann aus den Aminosäuren die Aminogruppe selbst beim Kochen mit Säuren und Alkalien nicht abgespalten werden.

Neuerdings suchte R. Bertel**) den Nachweis zu erbringen, daß bei der Oxydation des Tyrosins durch Tyrosinase Homogentisinsäure, NH_3 und CO_2 gebildet werden. Gestützt auf diese Beobachtung glaubte F. Czapek***) hierin einen sicher nachgewiesenen Fall von enzymatischer Desamidierung der Aminosäuren erblicken zu dürfen, und das Tyrosinferment sollte nach ihm „ebensogut als eine Oxydase wie als eine Desamidase“ anzusehen sein. Meine eigene Untersuchung hat jedoch ergeben, daß der ausgiebige Tyrosinumsatz in Bambusschößlingen und anderen wachsenden

*) Wl. Butkewitsch, Umwandlung der Eiweißstoffe durch die niederen Pilze usw. Pringsheims Jahrb. f. wissenschaftl. Botanik 38, 147.

**) R. Bertel, Über Tyrosinabbau in Keimpflanzen. Ber. d. d. bot. Gesellsch. 20, 460.

***) F. Czapek, Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweißbildung der Schimmelpilze. Diese Beiträge 2, 588.

Pflanzenteilen ganz ohne Beteiligung der Tyrosinase vor sich geht, und demnach erscheint mir das regelmäßige Zustandekommen des Tyrosinabbaues durch diese Oxydase ausgeschlossen. Ich will diesen Punkt in einer späteren Abhandlung näher erörtern, in welcher die Ergebnisse meiner seit Jahren fortgesetzten Studien über die Bildungsweise der Enzyme in assimilierenden und wachsenden Pflanzenorganen ausführlich dargestellt werden. Meine Ansicht wurde ferner durch die neuen Versuche K. Saitos*) bestätigt, der fand, daß das Auftreten der Ammoniak- und Tyrosinase-Reaktion in tyrosinhaltigen Kulturlösungen mehrerer Schimmelpilze keinen Parallelismus aufweist, so daß die Desamidierung des Tyrosins wohl nicht als Funktion des genannten Enzyms angesehen werden darf.

Aus dem Pflanzenreich ist bisher, abgesehen von dem eben besprochenen fraglichen Fall und der Urease, dem längst bekannten harnstoffspaltenden Enzym, kein Ammoniak abspaltendes Enzym bekannt.

Hingegen liegen einschlägige Beobachtungen auf tierphysiologischem Gebiete vor. M. Jacoby**) hat eine deutliche Zunahme des Ammoniak-N in dem unter Toluolzusatz aufbewahrten Lebersaft beobachtet, und dies auf Enzymwirkung zurückgeführt. Er fand ferner, daß eine Vermehrung des Amidstickstoffes und zwar auf Kosten des Aminosäurestickstoffes erfolgt. O. Loewi***) hatte schon früher nachgewiesen, daß Glykokoll und Leucin unter Einwirkung des Lebersaftes einen alkoholätherlöslichen, mit einer leicht abspaltbaren Amidgruppe versehenen Körper liefern. Nach Jacoby übt jedoch das Leberenzym keine Einwirkung auf Glykokoll aus. Unter den Produkten der Eiweißspaltung durch die proteolytischen Enzyme tritt öfters Ammoniak auf, wie es von Hirschler†), Kutscher††) u. a. für tryptische und von Zunz†††) für peptische Eiweißverdauung nachgewiesen wurde. Wir können jedoch bei diesen Fällen, wegen der großen Kompliziertheit des Eiweißmoleküls, keine Einsicht in den Chemismus der Ammoniakabspaltung gewinnen. Bekanntlich sind Trypsin und Pepsin völlig wirkungslos auf Aminosäuren. Amide und

*) K. Saito, Botanical Magazine (Tokio). No. 201. Nov. 1903.

) M. Jacoby, Über die fermentative Eiweißspaltung und Ammoniakbildung in der Leber. Zeitschr. f. physiol. Chemie **30, 149.

***) O. Loewi, Über das harnstoffbildende Ferment der Leber. Zeitschr. f. physiol. Chemie **25**, 511.

†) A. Hirschler, Zeitschr. f. physiol. Chemie **10**, 302.

††) F. Kutscher, Endprodukte der Trypsinverdauung. 1899.

†††) E. Zunz, Zeitschr. f. physiol. Chemie **28**, 132.

andere einfachere Stickstoffverbindungen werden ebenfalls nicht von den proteolytischen Enzymen angegriffen. W. Gulewitsch*) ließ das in verschiedener Weise rein dargestellte Trypsin auf Amide, Harnstoffderivate und zahlreiche andere Verbindungen einwirken und erhielt ein durchaus negatives Resultat. In einer erst vor kurzem erschienenen Abhandlung zeigte ferner M. Schwarzschild**), daß Trypsin nicht imstande ist, Ammoniak aus verschiedenen Amiden, z. B. Asparagin, Acetamid, Harnstoff, Biuret, Oxamid, Benzamid, Glycinamid usw. abzuspalten. Die einzige Ausnahme davon bildete die Curtiussche Glycinbase (Hexaglycylglycinäthylester), die sich gegen Pepsinsalzsäure ganz indifferent verhielt. Dagegen kommen, wie es scheint, in der Leber Enzyme vor, welche auf Amidkörper wirken. Vor längerer Zeit beobachtete O. Schmiedeberg***), daß der Leberbrei Hippursäure in Glykokoll und Benzoesäure zerlegt. Neuerdings studierte M. Gonnermann†) die Wirkung des Leber- und Nierenhistozyms auf einige Amide und Imide. Er digerierte Leberbrei vom Schaf mit Acetamid, Oxamid, Benzamid usw., mit 1 Proz. Fluornatrium als Antiseptikum, und konnte in gewissen Fällen das Auftreten der Spaltungsprodukte konstatieren.

Bei dieser Sachlage schien es mir von einigem Interesse, zu erforschen, ob im Pflanzenorganismus Enzyme vorkommen, welche aus Amidverbindungen Ammoniak abspalten können. Als mein erstes Untersuchungsobjekt wählte ich Aspergillus niger, welcher Pilz sich bei derartigen Experimental-Studien sehr bequem verwenden läßt. Unsere Kenntnis über den Nährwert verschiedener Stickstoffverbindungen für diesen Pilz wurde durch die Arbeiten von F. Czapek††) erheblich erweitert, worauf ich öfters Bezug nehmen werde.

Methodisches.

Da der Zweck der vorliegenden Untersuchung in erster Linie war, den Beweis zu erbringen, daß die Ammoniakabspaltung aus gewissen Stickstoffverbindungen ein von der Lebenstätigkeit des Pilzes abtrennbarer, enzymatischer Vorgang ist, wurde die

*) Wl. Gulewitsch, Über das Verhalten des Trypsins gegen einfachere organische Verbindungen. Zeitschr. f. physiol. Chemie **27**, 540.

) M. Schwarzschild, Über die Wirkungsweise des Trypsins. Diese Beiträge **4, 155.

***) O. Schmiedeberg, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm. **14**, 288.

†) M. Gonnermann, Über die Verseifbarkeit einiger Säure-Amide und Säure-Anilide durch Fermente. Pflügers Archiv f. ges. Physiol. **89**, 493.

††) F. Czapek, Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweißbildung der Schimmelpilze. Diese Beiträge **1** bis **3**.

Isolierung der betreffenden Enzyme vorläufig nicht angestrebt. In allen meinen Versuchen ließ ich daher die zerriebenen oder mit Aceton abgetöteten Mycelmassen von Aspergillus niger, unter strenger Durchführung der Antiseptik, auf verschiedene Stickstoffverbindungen einwirken.

In einer Reihe von Fällen wurde die von der Kulturflüssigkeit abgehobene Pilzmasse in ein feinmaschiges Sieb gebracht, kurze Zeit einem starken Wasserstrome ausgesetzt, um sie möglichst von den Konidien zu befreien und die letzten Spuren von Kulturflüssigkeit zu entfernen, dann durch Pressen so entwässert, daß sie leicht zu einem groben Pulver zerrieben werden konnte. Ein bestimmtes Quantum dieses nahezu lufttrockenen Pilzpulvers wurde mit 10 bis 25 ccm Wasser und etwas Kieselgur gründlich verrieben. Die so erhaltenen dickbreiigen Flüssigkeiten kamen in ein mit Korkverschluß versehenes Kölbchen mit der zu prüfenden Substanz und 2 bis 4 Proz. Toluol als Antiseptikum. Die Kölbchen wurden während bestimmter Zeitintervalle im Thermostaten gehalten. Die Flüssigkeiten erwiesen sich nach der Digestion als absolut keimfrei.

In anderen Fällen habe ich die von R. und W. Albert und E. Buchner zum Nachweis der Hefezymase so erfolgreich ausgearbeitete Acetonmethode*) in Anwendung gebracht.

Die in oben beschriebener Weise entwässerte und zerkleinerte Pilzsubstanz wurde in das mehrfache Volumen reinen Acetons eingetragen und unter häufigem Umrühren und einmaligem Wechsel der Flüssigkeit 15 Minuten lang darin belassen. Die vom Aceton abfiltrierte Pilzsubstanz wurde durch Pressen zwischen Filtrierpapier vom Rest der Flüssigkeit befreit, dann mit Äther wiederholt gewaschen. Nach Verdunsten des Äthers wurde die Masse zu feinstem Pulver zerrieben und über Nacht im Thermostaten gehalten. Dieses Präparat ist im folgenden als Acetonpilzpulver bezeichnet. In einigen Fällen habe ich die Pilzsubstanz, direkt bei 37° C getrocknet und fein pulverisiert, angewandt. Eine bestimmte Menge des Pilzpulvers wurde mit 10 bis 20 ccm Lösung der zu prüfenden Substanz, unter Zusatz von Toluol, im gut verschließbaren Kölbchen im Thermostaten gehalten.

Mit der gekochten Pilzsubstanz wurden Kontrollversuche, unter sonst gleichen Bedingungen, angestellt.

Nach Beendigung der Versuche wurde eine quantitative Bestimmung des entstandenen Ammoniaks ausgeführt. Sie geschah in den filtrierten Versuchsflüssigkeiten, wenn es zulässig war, durch Destillation mit Magnesia; eine $^1/_{10}$-Normal-Schwefelsäurelösung diente dabei zur Absorption des Ammoniaks. Die Harnstoffderivate und Säureamide konnten jedoch nicht in dieser Weise behandelt werden, weil sie oft schon bei gelindem Erwärmen mit Magnesia teilweise Zersetzung erleiden. Bei den Versuchen mit den genannten Verbindungen kam deshalb die Schlösingsche Methode ausschließlich zur Anwendung. Die filtrierte Flüssigkeit

*) H. u. E. Buchner u. M. Hahn, Die Zymasegärung, S. 266.

wurde mit dem gleichen Volumen alkalifreier Kalkmilch innig gemischt und sogleich in einen luftdicht konstruierten Schlösingschen Apparat hineingebracht. Dort blieb das Gemisch 3 bis 4 Tage lang bei 10 bis 15° C. Zur Absorption des ausgetriebenen Ammoniaks diente eine $^1/_{10}$-Normallösung von Schwefelsäure.

Die angewandten chemischen Präparate stammten zumeist von Merck („pro analysi") und zum Teil aus dem hiesigen chemischen Institute. Sie wurden, wenn die Menge ausreichte, nochmals durch Umkristallisation gereinigt. Das Pilzmaterial war ausschließlich in Pepton-Zucker-Nährlösungen*) kultiviert; die Ernte erfolgte gewöhnlich nach 3 bis 5wöchentlicher Kulturdauer.

1. Harnstoff.

Das harnstoffabbauende Enzym war bisher nur bei der biologischen Gruppe der Urobakterien bekannt. Meine Untersuchung hat nun ergeben, daß auch im Aspergillus ein ähnlich wirkendes Enzym vorkommt. Im folgenden werden einige darauf bezügliche Versuchsprotokolle wiedergegeben.

Versuch 1. 1,5 g entwässerte Pilzsubstanz wurde mit etwas Kieselgur gut zerrieben und mit 50 ccm 1 proz. Harnstofflösung digeriert. Von der Mischung wurde die eine Hälfte (B) kurze Zeit aufgekocht, die andere (A) nicht**). Versuchsdauer 10 Tage bei 37° C.

Die Ammoniakbestimmung nach Schlösing ergab:

(A) 0,0352 g. (B) 0,0034 g.

Gebildete Ammoniakmenge = 0,0318 g.

Mit Neßlers Reagens gab (A) starke Ammoniakreaktion, aber (B) eine kaum merkliche.

Versuch 2. Zwei Kölbchen wurden mit je 2 g Pilzsubstanz beschickt, die mit etwas Kieselgur und 20 ccm Wasser gut zerrieben war. Nach kurzem Aufkochen eines der Kölbchen (B) wurde zu jedem 0,5 g Harnstoff gegeben. Versuchsdauer 2 Tage bei 35° C.

Die Ammoniakbestimmung ergab:

(A) 0,01632 g. (B) 0,0013 g.

Gebildete Ammoniakmenge = 0,015 g.

Versuch 3. Versuchsanstellung wie bei vorigem Versuch. Pilzsubstanz 1,5 g, Harnstoff 1 g und Wasser 20 ccm. 9 Tage bei 35° C.

(A) 0,0329 g. (B)***) 0,0023 g.

Gebildete Ammoniakmenge = 0,0306 g.

Versuch 4. Pilzsubstanz 1,5 g, Harnstoff 0,5 g und Wasser 20 ccm. 25 Tage bei 20° C.

(A) 0,0217 g. (B) 0,0022 g

Gebildete Ammoniakmenge = 0,0195 g.

Versuch 5. 0,5 g Acetonpulver wurde mit 25 ccm Wasser digeriert, darauf 0,5 g Harnstoff zugesetzt. 7 Tage bei 35° C.

(A) 0,0246 g. (B) 0,0012 g.

Gebildete Ammoniakmenge = 0,0234 g.

---

*) Pepton 1 bis 3 Proz., Zucker 0,5 bis 3 Proz., Nährsalze 0,2 Proz.

**) Mit Toluolzusatz, wie auch in allen folgenden Versuchen.

***) (B) bedeutet überall die gekochte Kontrollprobe.

Versuch 6. Direkt getrocknetes Pilzpulver 0,5 g, Harnstoff 0,5 g und Wasser 20 ccm. 28 Tage bei 20° C.

(A) 0,0211 g. (B) 0,0037 g.
Gebildete Ammoniakmenge = 0,0174 g.

Aus den mitgeteilten Versuchsresultaten geht sehr deutlich hervor, daß im Mycelium von Aspergillus niger ein Enzym vorkommt, das aus Harnstoff Ammoniak abzuspalten vermag. Harnstoff wird hierbei offenbar unter Wasseraufnahme in kohlensaures Ammoniak verwandelt.

Das Vorkommen eines ureaseartigen Enzyms in Mycelpilzen veranlaßt uns zu einigen allgemeinen Betrachtungen. Zunächst ist es sehr wahrscheinlich, daß dieses Enzym eine viel weitere Verbreitung besitzt, als man bisher angenommen hat*). Das ureaseartige Enzym ist meines Erachtens überall dort tätig, wo die Verarbeitung des Harnstoffes als Stickstoffnahrung stattfindet; das freigewordene Ammoniak wird dann zu synthetischen Vorgängen verwendet. Bei den Urobakterien dient die Urease, wie mir scheint, auch einem biologischen Zweck und wird dementsprechend auffallend reichlich produziert, nämlich um die Alkaleszenz des Substrates zu erhöhen und alle oder die meisten konkurrierenden Organismen zu verdrängen**).

Die Ansichten über das Wesen der Urobakterien-Urease gehen noch weit auseinander. Beijerinck***) behauptet, in Übereinstimmung mit Leube, daß das Enzym nie aus den Zellen hinausdiffundiert, während Miquel früher das Gegenteil angab. Ich bemerke hierzu nur, daß das harnstoffspaltende Enzym von Aspergillus niger nicht in merklicher Weise in die Kulturflüssigkeit ausgeschieden wird, wie aus folgendem Versuch hervorgeht.

Versuch 7. Eine 4 Wochen alte Kulturlösung†) von Aspergillus niger wurde von der Pilzmasse abfiltriert und in drei gleiche Portionen von je 25 ccm geteilt; die erste (A) blieb ungekocht, die zweite (B) wurde kurz aufgekocht und mit je 0.5 g Harnstoff versetzt; die dritte (C) blieb ohne Kochen und Harnstoffzusatz. Versuchsdauer 25 Tage bei 20° C.

Die Ammoniakbestimmung ergab:

(A) 0,0153 g. (B) 0,0136 g. (C) 0,0153 g.

---

*) Nach einem Versuchsresultat Jacobys ist es wahrscheinlich, daß auch dem Leberenzym die Fähigkeit zukommt, aus Harnstoff Ammoniak abzuspalten.

**) Eine ähnliche Ansicht wurde schon von J. Wortmann in betreff der alkoholischen Gärung geäußert. Vergl. hierzu auch M. W. Beijerinck, Centralbl. f. Bakt., Abt. II, 7, Nr. 2.

***) Beijerinck, loc. cit. 55.

†) Pepton 2 Proz., Rohrzucker 1 Proz., Nährsalze 0,2 Proz.

Die Abspaltung des Harnstoffes durch das Pilzenzym findet also intracellular statt, was bei der bekannten Durchlässigkeit der Plasmahaut für Harnstoff ohne weiteres verständlich ist.

Wir wollen nun unser Augenmerk auf einige wichtigere Repräsentanten von Harnstoffderivaten richten.

2. Biuret $OC\langle{}^{NH-CO-NH_2}_{NH_2}$.

Biuret wird zwar vom Pilzenzym unter Ammoniakabspaltung angegriffen, aber in etwas geringerem Maße als Harnstoff, wie folgende Versuche zeigen.

Versuch 8. 1 g Pilzsubstanz wird mit 15 ccm Wasser und etwas Kieselgur zerrieben, darauf 0,2 g Biuret hinzugefügt. Versuchsdauer 9 Tage bei 35° C.

Die Ammoniakbestimmung nach Schlösing ergab:

(A) 0,0065 g. (B) 0,0016 g.

Gebildete Ammoniakmenge 0,0049 g.

Versuch 9. Wie oben, mit 1 g Pilzsubstanz, 0,1 g Biuret und 10 ccm Wasser. 9 Tage bei 35° C.

(A) 0,0054 g. (B) 0,001 g.

Gebildete Ammoniakmenge = 0,0044 g.

3. Urethan $CO\langle{}^{NH_2}_{OC_2H_5}$.

Urethan, der Aethylester der Karbaminsäure wird merkwürdigerweise kaum vom Pilzenzym angegriffen.

Versuch 10. 1 g Pilzsubstanz mit 15 ccm Wasser und etwas Kieselgur zerrieben, darauf 0,5 g Urethan hinzugefügt. 9 Tage bei 35° C.

Gebildete Ammoniakmenge = 0.

Versuch 11. 0,2 g Acetonpilzpulver in 20 ccm Wasser verteilt. darin 0,5 g Urethan gelöst. 6 Tage bei 35° C.

Gebildete Ammoniakmenge = 0.

Die Beständigkeit des Urethans gegen das Pilzenzym zwingt zu der Annahme, daß für die Einwirkung des Pilzenzyms auf die Atomgruppe — $CO.NH_2$ die Struktur des ganzen Moleküls maßgebend ist.

4. Guanidin $NH=C\langle{}^{NH_2}_{NH_2}$.

Aus der Gruppe der Amidine wurde Guanidin untersucht.

Versuch 12. 1,5 g Pilzsubstanz mit 20 ccm Wasser und etwas Kieselgur zerrieben, dann 0,2 g Guanidinchlorhydrat hinzugegeben. 9 Tage bei 35° C.

Gebildete Ammoniakmenge = 0.

Versuch 13. 0,2 g Guanidinkarbonat in 20 ccm Wasser gelöst und mit Oxalsäure neutralisiert, darauf 0,2 g Acetonpilzpulver hineingetan. 6 Tage bei 35° C.

Gebildete Ammoniakmenge = 0.

Aus obigen Resultaten ist zu entnehmen, daß bei Verarbeitung der Amidine im Pilzkörper eine enzymatische Abspaltung des Ammoniaks wahrscheinlich nicht erfolgt*).

Ich habe ferner mehrere Versuche mit den Ureiden und zwar mit

5. Allantoïn $CO\langle^{NH-CO}_{NH-CH.NH.CO.NH_2}$

und

6. Harnsäure (Natronsalz) $CO\langle^{HN-C-NH}_{NH-CO}$ (C=C, beide C–NH > CO)

angestellt; die Versuche fielen jedoch durchaus negativ aus. Man kann wohl hieraus folgern, daß bei der Ausnutzung dieser Verbindungen für die Pilzernährung keine Abspaltung des Harnstoffs bzw. Ammoniaks erfolgt, sondern die direkte Überführung etwa in Aminosäuren durch anderweitige Ringspaltung stattfindet**).

7. Acetamid $CH_3-CO.NH_2$.

Das Mycelium von Aspergillus niger enthält ein Enzym, das aus Acetamid NH_3 abspaltet.

Versuch 14. 1,5 g Pilzsubstanz mit 20 ccm Wasser und etwas Kieselgur zerrieben, dazu 0,5 g Acetamid. 9 Tage bei 35° C.

Die Ammoniakbestimmung nach Schlösing ergab:

(A) 0,0391 g. (B) 0,0122 g.

Gebildete Ammoniakmenge = 0,0269 g.

Versuch 15. 0,5 g Acetonpilzpulver in 25 ccm Wasser verteilt, dazu 0,5 g Acetamid. 7 Tage bei 35° C.

(A) 0,0337 g. (B) 0,0134 g.

Gebildete Ammoniakmenge = 0,0203 g.

Die Ammoniakbestimmung bei diesen Versuchen ist immer mit der Schwierigkeit verbunden, daß das Acetamid mit Kalk allein schon bei gewöhnlicher Temperatur etwas Ammoniak abspaltet; darauf ist die nicht unbedeutende Ammoniakmenge in der gekochten Kontrollprobe zurückzuführen, die sich jedoch vor Kalkzusatz bei qualitativer Prüfung fast ammoniakfrei erwies.

Acetamid ist bekanntlich eine gute Stickstoffquelle für verschiedenartige Pilze. Wir sind nunmehr zur Annahme berechtigt, daß bei der Verarbeitung des Acetamids im Pilzkörper eine enzymatische Ammoniakabspaltung, wenigstens zum Teil, erfolgt***).

---

*) Vergl. hierzu Czapek, loc. cit. S. 574.

**) Czapek, loc. cit. S. 580.

***) Dieser Annahme steht auch die Tatsache nicht im Wege, daß essigsaures Ammoniak keine Stickstoffquelle für Aspergillus niger ist (Czapek, loc. cit. S. 582), da die enzymatische Spaltung des Acetamids intracellular stattfindet und das freigewordene Ammoniak sogleich zu synthetischen Vorgängen verwendet werden kann.

8. Oxamid $\begin{array}{l} CO.NH \\ | \\ CO.NH_2. \end{array}$

Dieses sehr schwer lösliche Säureamid gibt ebenfalls unter Einwirkung des Pilzenzyms Ammoniak ab*).

Versuch 16. 0,5 g Acetonpilzpulver in 25 ccm Wasser verteilt, dazu 0,5 g Oxamid. 7 Tage bei 35° C.

Die Ammoniakbestimmung ergab:

(A) 0,0071 g. (B) 0,0012 g.

Gebildete Ammoniakmenge = 0,0059 g.

9. Benzamid $C_6H_5-CO.NH_2$.

Versuch 17. 1 g Pilzsubstanz mit 20 ccm Wasser und etwas Kieselgur zerrieben, dazu 0,2 g Benzamid. 9 Tage bei 35° C.

(A) 0,002 g. (B) 0,0015 g.

Gebildete Ammoniakmenge = 0,0005 g.

Einige andere Versuche ergaben nur negative Resultate.

Die Unangreifbarkeit des Benzamids durch das Pilzenzym steht gut in Einklang mit der Tatsache, daß diese Verbindung als Stickstoffquelle für Aspergillus niger ganz untauglich ist. Nach Gonnermann soll jedoch Benzamid durch das Leber- und Nierenhistozym spaltbar sein**).

10. Asparagin $\begin{array}{l} CH_2-CO.NH_2 \\ | \\ NH_2.CH-CO.OH. \end{array}$

Asparagin scheint unter Einwirkung des Pilzenzyms nur eine kleine Menge des Ammoniaks abzugeben.

Versuch 18. 2 g Pilzsubstanz mit etwas Kieselgur und 20 ccm Wasser zerrieben, dazu 1 g Asparagin. 8 Tage bei 35° C.

(A) 0,0041 g. (B) 0,0022 g.

Gebildete Ammoniakmenge = 0,0019 g.

Versuch 19. 0,5 g Acetonpilzpulver in 25 ccm Wasser verteilt, 0,5 g Asparagin hinzugegeben. 9 Tage bei 35° C.

(A) 0,0041 g. (B) 0,0015 g.

Gebildete Ammoniakmenge = 0,0026 g.

Hieraus möchten wir den Schluß ziehen, daß der gute Nährwert des Asparagins nicht auf seine Eigenschaft als Säureamid, sondern hauptsächlich auf die als Aminosäure zurückzuführen ist.

Schließlich wollen wir

11. Hippursäure $C_6H_5CO.NH-CH_2-CO.OH$

in ihrem Verhalten gegen das Pilzenzym betrachten.

Versuch 20. 1 g Pilzsubstanz wurde mit 10 ccm Wasser und etwas Kieselgur gut zerrieben, dazu 0,5 g Hippursäure und die gleiche Menge $CaCO_3$ zugesetzt. Versuchsdauer 25 Tage bei 20 bis 35° C.

---

*) Oxaminsäure ist nach Czapek (loc. cit. S. 570) eine gute Stickstoffquelle für Aspergillus niger.

**) M. Gonnermann, Pflügers Archiv 89, 507.

Das Versuchsgemisch wurde abfiltriert und das Filtrat mit einigen Tropfen konz. Phosphorsäure versetzt. Hierauf entstand nach kurzer Zeit ein reichlicher kristallinischer Niederschlag, der zum Teil aus unveränderter Hippursäure bestand. Der Niederschlag wurde nach dem Abfiltrieren mit Petroleumäther ausgezogen. Beim Verdunsten des Extraktes schieden sich zahlreiche plättchenförmige Kristalle ab, die sich bei qualitativer Prüfung als Benozoesäure erwiesen.

Hippursäure wird also durch das Pilzenzym in ihre beiden Komponenten, Glykokoll und Benzoesäure, zerlegt. Daß diese enzymatische Abspaltung der Ausnutzung von Hippursäure im Pilzkörper vorangeht, ist kaum zu bezweifeln. Bekanntlich wird Hippursäure auch durch die Lebenstätigkeit gewisser Bakterien gespalten*), aber ob dabei Urease tätig ist, bleibt noch unentschieden. Wie eingangs erwähnt, kommt auch in den Leberzellen ein Hippursäure abbauendes Enzym vor.

Ich habe ferner eine Reihe von Versuchen angestellt, um zu sehen, ob es im Pilzkörper Enzyme gibt, welche die festgebundene Amidgruppe aus Aminosäuren in Freiheit setzen können. Die chemische Wirkungsweise solcher Enzyme, falls sie wirklich existieren, dürfte von der oben geschilderten gänzlich verschieden sein. Immerhin ist es denkbar, daß die Monoaminosäuren unter Wassereintritt in Ammoniak und entsprechende Oxyfettsäuren zerlegt werden. Meine darauf bezüglichen zahlreichen Versuche mit den gewöhnlichsten Monoaminosäuren, und zwar mit Glykokoll, Leucin und Asparaginsäure, ergaben bisher nur negative Resultate, so daß die nähere Beschreibung der Versuche hier unterbleiben kann.

In dieser Hinsicht nahm Alanin (α-Aminopropionsäure) eine Sonderstellung ein; es gibt durch die Einwirkung des Pilzenzyms eine kleine Menge von Ammoniak ab.

Versuch 21. 0,5 g Acetonpilzpulver in 25 ccm Wasser verteilt, dazu 0,25 g Alanin. 7 Tage bei 35° C.

(A) 0,0034 g. (B) 0,0012 g.
Gebildete Ammoniakmenge = 0,0022 g.

Versuch 22. 1 g Pilzsubstanz mit 20 ccm Wasser und etwas Kieselgur zerrieben, dazu 0,2 g Alanin. 10 Tage bei 35° C.

(A) 0,0031 g. (B) 0,0012 g.
Gebildete Ammoniakmenge = 0,0019 g.

Diese Befunde sind von gewissem Interesse in Zusammenhang mit der von Czapek**) ermittelten Tatsache, daß Alanin, in Gegensatz zu anderen Aminosäuren, dem Aspergillus niger ebensogut als Kohlenstoffquelle wie als Stickstoffquelle dient.

---

*) Van Tieghem, Sur la fermentation ammoniacale. Compt. rend. 58, 533.

**) Czapek, Diese Beiträge 1, 547.

Tyrosin, das Oxyphenylderivat des Alanins, verhielt sich ähnlich. Ich will bei dieser Gelegenheit ausdrücklich bemerken, daß im Aspergillus niger keine Tyrosinase nachweisbar ist.

Die Untersuchung hat die Tatsache zu Tage gefördert, daß es im Mycelium des Aspergillus niger ein Enzym oder eine Gruppe von Enzymen gibt, welche die Abspaltung von Ammoniak aus Harnstoff, Biuret und gewissen Säureamiden bewirken. Inwieweit diese Enzyme miteinander und etwa mit der Urease zu identifizieren sind, kann zurzeit nicht entschieden werden, ich beabsichtige aber hierüber weiter zu arbeiten. Dennoch wage ich den Vorschlag zu machen, diese Enzyme kollektiv als „Amidasen" zu bezeichnen. Es ist noch zu erforschen, in welcher Weise die Produktion dieser Enzyme durch die verschiedenartigen äußeren Bedingungen, zumal die Ernährungsverhältnisse, beeinflußt wird.

Daß die Amidasen nichts mit den proteolytischen Enzymen gemein haben, geht aus den schon erwähnten Beobachtungen von Gulewitsch und Schwarzschild hervor. Voraussichtlich wird die weitere Verfolgung der physiologischen Wirksamkeit und der Verbreitung dieser Enzyme noch manche Aufklärung bezüglich des Umsatzes der Stickstoffverbindungen im Organismus und des Nährwertes verschiedener Verbindungen bringen.

Diese Untersuchung wurde im botanischen Institute der Universität zu Tokio ausgeführt und wird noch weiter fortgesetzt. Herrn Prof. M. Miyoshi möchte ich für seine wohlwollende Unterstützung meinen wärmsten Dank aussprechen.

Januar 1904.

Kürzere Mitteilungen.

3. Über die Labwirkung des Blutserums.

Von **Ivar Bang.**

Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium zu Lund (Schweden).

Nachdem Rödén, ein Schüler Hammarstens, die labhemmende Wirkung des Blutserums nachgewiesen hatte, zeigten Fuld und Spiro*), daß das Blutserum sowohl eine labende als auch labhemmende Substanz enthält, wovon die erstere sich mit dem Euglobulin ausfällen läßt, während die letztere, die labhemmende, dem Pseudoglobulin entspricht.

Betreffend der Beziehung des labähnlichen Fermentes zum echten Lab sprechen sich Fuld und Spiro**) in folgender Weise aus: „Daß man jedoch das im Blute gefundene Lab vorläufig nicht mit dem echten Chymosin identifizieren darf, geht sowohl aus der etwas anderen Beschaffenheit des Gerinnsels hervor, als auch aus der von uns ermittelten Tatsache, daß das Chymosin sich gegen Salzfällung ganz anders verhält, da es sich erst bei 80 bis 100 Proz. Sättigung mit Ammonsulfat ausscheidet." Dazu sei bemerkt, daß die labende Substanz aus dem Serum mit dem Euglobulin schon bei 28 bis 33 Sättigungsprozenten ausfällt.

Aus verschiedenen Gründen fand ich es notwendig, mir eine persönliche Auffassung über diese Verhältnisse zu verschaffen. Mit welchem Resultate, werde ich hier berichten.

Ich arbeitete ausschließlich mit Plasma und Serum vom Pferde. Die hauptsächlichen Angaben von Fuld und Spiro wurden zuerst bestätigt. Weiter ließ sich auch bald zeigen, daß die Labwirkung jedenfalls keine Eigenschaft des Euglobulins selbst ist, da ich auch inaktives Serum angetroffen habe. Die labende Substanz wird also mit dem Euglobulinniederschlag niedergerissen. Weiter habe ich feststellen können, daß die Koagulation nur bei Gegenwart von löslichen Kalksalzen stattfindet und endlich, daß eine Kaseinlösung ganz wie die Milch koaguliert wird. Selbstverständlich wurden Kontrollversuche ausgeführt, welche hier um so notwendiger waren, als die Gerinnung immer erst nach vielen Stunden eintrat.

---

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie **31**, 132 f. Daselbst auch die einschlägigen Literaturangaben.

**) a. a. O. S. 146.

Schon nach diesen Versuchen war es sehr wahrscheinlich, daß die Labwirkung des Pferdeblutserums einer wahren Chymosinwirkung entspricht, und daß das Gerinnsel aus Parakaseinkalk besteht. Die Untersuchung des Gerinnsels hat auch diese Vermutung bestätigt. Wenn man nämlich das Gerinnsel nach dem Auswaschen in 0,1 °/₀₀-NaOH löste, konnte man das Eiweiß vollständig durch Kochsalz aussalzen, mit Essigsäure eine reichliche Fällung erzielen und mit Kalziumchlorid das Parakasein wieder vollständig ausfällen.

Zur Entscheidung der Frage, ob das Chymosin der Euglobulinfraktion sich durch die Fällungsgrenzen vom gewöhnlichen Chymosin unterscheidet, ging ich von einem inaktiven Blutserum aus und versetzte dieses mit einer bekannten Labmenge:

1. 25 ccm Serum + 41 ccm Wasser . . . . + 34 ccm Ammonsulfat-Lösung
2. 25 „ „ + 40 „ „ + 1 ccm Lablösung + 34 „ „ „
3. 249 „ „ + 1 „ „ .

Die Euglobulinniederschläge im Versuche 1 und 2 wurden mit 100 ccm $^1/_3$ gesättigter Ammonsulfatlösung ausgewaschen und in 50 ccm Wasser gelöst.

1. 2 ccm von Nr. 1 + 2 ccm Milch. Nach 24 Stunden ungeronnen
2. 2 „ „ „ 2 + 2 „ „ „ $^3/_4$ Minuten koaguliert
3. 2 „ „ „ 3 + 2 „ „ „ 4 Minuten koaguliert.

Trotzdem also das Chymosin nicht von 34 Proz. Ammonsulfatsättigung niedergeschlagen wird, enthält der mit Lab versetzte und gründlich ausgewaschene Euglobulinniederschlag eine sehr reichliche Labmenge. Der Euglobulinniederschlag reißt also das Chymosin mit nieder.

Hiermit ist bewiesen, daß das Pferdeblutserum seine Labwirkung der Gegenwart eines Chymosins verdankt. Folgerichtig könnte man vermuten, daß die labhemmende Wirkung des Blutserums aus einem wahren Antilab besteht, obwohl dies natürlich hiermit nicht bewiesen ist.

Die Tatsache, daß das Euglobulin das Chymosin mit niederreißt, verdient nach meiner Ansicht eine gewisse Beachtung. Bekanntlich hat man den verschiedenen Globulinfraktionen bestimmte, z. B. antitoxische, antifermentative usw. Eigenschaften zugeschrieben, weil die Träger dieser Wirkungen aus dem Serum mit den Globulinfraktionen gefällt werden. Der mitgeteilte Befund dürfte zur Vorsicht gegenüber solchen Schlußfolgerungen mahnen.

Es ist auch nicht ohne Interesse, daß man das Fibrinogen nach Reye aus dem Plasma aussalzen kann, ohne daß das Chymosin mit niedergerissen wird, während wahrscheinlich das gesamte Lab mit dem ersten Globulinniederschlage niederfällt.

Das Globulin besitzt somit das Vermögen, andere Körper mit ganz verschiedenen Fällungsgrenzen mit niederzureißen. Es ist danach nicht unwahrscheinlich, daß andere Körper auf Globuline die umgekehrte Wirkung ausüben können, was in der Tat K. A. H. Mörner mit Seifenlösungen schon gezeigt hat. Man dürfte daher gut tun, die Individualität des Euglobulins und Pseudoglobulins so lange mit Vorsicht aufzunehmen, als sie nur mit Hilfe der Fällungsgrenzen bewiesen ist.

4. Zur Kenntnis des biologischen Arsennachweises.

Von **Walther Hausmann.**

Aus dem physiolog. Laboratorium der zoologischen Station zu Neapel*).

In folgenden Zeilen sei kurz über einige Beobachtungen berichtet, welche ich an einer Actinie, Aiptasia diaphana Rapp. machen konnte, die sich zu anderen Zwecken in Meerwasser, dem eine geringe Menge von arseniger Säure zugesetzt war, befand.

Nach kurzem Verweilen dieser Actinie in dem arsenhaltigen Meerwasser entwickelte sich ein unangenehm nach Knoblauch riechendes Gas. Es handelt sich hierbei wohl um die Bildung von Arsinen aus der arsenigen Säure, wie sie zuerst von Gosio**) bei Anwesenheit von Arsen in den Nährböden von Schimmelpilzen beschrieben wurde.

Die Actinie, Aiptasia diaphana, ist ein an sich glashelles Tier, welches aber durch die symbiotisch in ihm lebenden gelben Algenzellen***), Zooxanthellen, mehr oder minder gelb bis tief braun gefärbt ist. Es lag nahe, die Entwicklung der Arsine den Algenzellen und nicht den Actinien selbst zuzuschreiben.

In der Tat zeigte sich nun, daß die von den Actinien ausgeworfenen Algenzellen sehr deutlich in Arsenlösung nach Knoblauch rochen. Ein von den Algen fast befreites Tier und ein anderes, welches von vorneherein fast algenfrei war, entwickelten nur sehr schwach das riechende Gas. Da mir aber ein ganz algenfreies Tier nicht zur Verfügung stand, so läßt sich eine Mitwirkung der Actinien bei der Gasentwicklung nicht ganz ausschließen, doch ist die Entwicklung der Arsine sicher in der Hauptsache den mit der Actinie in Symbiose lebenden Algenzellen und nicht den Actinien zuzuschreiben.

Die Reaktion tritt ohne weitere Vorbereitung ein bei Anwesenheit von arseniger Säure in Meerwasser, in dem algenführende Aiptasien sich befinden. 0,03 mg As_2O_3 in 100 ccm Meerwasser waren auf diese Weise nach etwa 3 Stunden ganz deutlich nachweisbar, ebenso 0,005 mg in 100 ccm Meerwasser nach 24 Stunden.

Wie Maassen†) gefunden hat, werden durch den Schimmelpilz Penicillium brevicaule u. a. auch aus Tellur- und Selenverbindungen stark riechende Gase gebildet. Das aus den Tellurverbindungen riecht genau so wie die Arsine; das aus Selenverbindungen erzeugte eher merkaptanartig. Auch die algenführenden Aiptasien erzeugen aus tellurigsaurem Natrium intensiv nach Knoblauch riechende Verbindungen. Die aus

---

*) Der Arbeitsplatz an der zoologischen Station wurde mir vom k. und k. Unterrichtsministerium in Wien zugewiesen. Herrn Geheimrat Dohrn bin ich für sein außerordentliches Entgegenkommen zu größtem Danke verpflichtet, ebenso Herrn Cav. Dr. Lo Bianco für die reichliche Versorgung mit Material.

**) Archives italiennes de Biologie 18. Berichte der deutschen chem. Gesellschaft 30, 1024, 1897.

***) K. Brandt, Über die morphologische und physiologische Bedeutung des Chlorophylls. Mitteilungen aus der zoologischen Station in Neapel 1883, S. 191.

†) Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 18, 475.

selenigsaurem Natrium ebenfalls durch die braunen Aiptasien erzeugten Gase riechen äußerst unangenehm, merkaptanähnlich.

Eine größere Anzahl freier Algenzellen erzeugte in tellurig- resp. selenigsaures Natrium enthaltendem Meerwasser (2 ccm einer 0,1 proz. Lösung auf 100 ccm Meerwasser) dieselbe Reaktion, so daß auch hier die Algen jedenfalls hauptsächlich als die Gasproduzenten aufzufassen sind.

Wenn die Actinie, Aiptasia diaphana, sich in Giftlösungen befindet, so beginnt sie ziemlich rasch blässer zu werden und am Boden des Gefäßes zeigt sich ein brauner Niederschlag, der aus den ausgeworfenen Zooxanthellen besteht*).

Brandt**) hat durch mehrwöchentliche Verdunklung von Aiptasia diaphana vollkommen algenfreie Tiere erhalten. Es gelingt nun manchmal durch Einsetzung dieser Actinie in Giftlösungen, sehr rasch fast algenfreie Tiere zu erhalten. So waren z. B. zwei dunkle Aiptasien in 100 ccm Meerwasser bei Anwesenheit von 0,5 resp. 1 ccm einer 0,01 proz. Lösung von arseniger Säure nach 10 Tagen fast farblos geworden, ebenso eine andere, welche in 100 ccm Meerwasser und 1 ccm einer 0,1 proz. Lösung von Chinin-Hydrochlorat sich befand. In zwei Fällen war nach gleichzeitiger Verdunklung und Vergiftung mit 2 ccm einer 0,1 proz. Chinin-Hydrochlorat-Lösung auf 100 ccm Meerwasser schon in drei Tagen der größte Teil der Algen ausgewandert. Auch der Aufenthalt in ungewechseltem Meerwasser genügt, um nach 1 bis 2 Wochen sehr reichliche Algenauswanderung hervorzurufen.

Es sei nachdrücklich darauf hingewiesen, daß es bei Aiptasia diaphana nur selten gelingt, durch Vergiftung eine vollkommene Trennung der symbiotisch lebenden Organismen zu erzielen. Die Möglichkeit einer Symbiosentrennung durch Gifte sei nur deshalb mitgeteilt, weil diese Methode vielleicht bei anderen Objekten zu konstanten Resultaten führt und eventuell zweifelhafte Symbiosen aufzuklären imstande ist.

5. Wirkung der Radiumstrahlen auf Chymosin.

Von **Sigval Schmidt-Nielsen.**

Die kräftigen physiologischen Wirkungen des Radiums lassen annehmen, daß es auch einen Einfluß auf Enzyme ausübt.

Für eine Untersuchung der Radiumwirkung auf Enzyme eignet sich besonders das Chymosin, einmal, weil sich die relative Enzymmenge in seiner Lösung mit großer Genauigkeit mittels der Koagulationszeit Milch gegenüber leicht bestimmen läßt, sodann, weil ich durch frühere Untersuchungen (diese Zeitschrift **5**, 367) gefunden habe, daß es von ultravioletten Strahlen leicht angegriffen wird.

*) Durch Herrn Dr. Lo Bianko wurde ich bei Beginn meiner Versuche, die ich an den Aiptasien zu anderen Zwecken unternommen hatte, darauf aufmerksam gemacht, daß es sich hierbei um Auswanderung der Algen handle. Herrn Dr. Lo Bianko sei auch an dieser Stelle mein bester Dank ausgesprochen.

**) loc. cit.

Die ersten Versuche konnte ich im Monate Juli 1903 im Finsenschen Lichtinstitute in Kopenhagen vornehmen, wo 1 g eines Präparates mit einer Intensität von etwa 1000 (die des Urans gleich 1 gesetzt) zu meiner Verfügung stand. Das Präparat war in einem Glasröhrchen eingeschlossen. Dieses wurde während des Versuches in ein Probierröhrchen mit der Versuchsflüssigkeit eingesenkt. Zu jedem Versuche wurden nur 2 ccm Chymosinlösung verwendet, damit alle Teile der Flüssigkeit möglichst stark von den Strahlen getroffen würden. Die Chymosinlösung war aus einem Hansenschen (Kopenhagen) Käselabextrakt durch Verdünnung auf $^1/_{20}$ bereitet.

Gleich nach beendeter Bestrahlung wurden die Koagulationszeiten mit 0,1 ccm Enzymlösung gegen 10 ccm Ziegenmilch*) bei 37° bestimmt.

Versuch vom 26. Juli 1903. Nach 24stündiger Bestrahlung war die Koagulationszeit von 3 Min. auf $5^1/_4$ Min. erhöht.

Versuch vom 27. Juli 1903. Nach 24stündiger Exposition betrug die Koagulationszeit 5 Min. für die bestrahlte Probe, 4 Min. für die Kontrollprobe.

In diesem Falle war die Außenseite des Versuchsröhrchens mit einer dünnen Staniolplatte bedeckt.

Die Exposition geschah in beiden Versuchen im Dunkeln.

Im Monate Dezember 1903 war ich infolge des freundlichen Entgegenkommens des Herrn Professor K. Angström (Upsala) in der Lage, 0,1 g eines dem physikalischen Nobelinstitute gehörigen Radiumpräparates mit einer Intensität von etwa 1 800 000 (aus der Société centrale de produits chimiques, Ancienne Maison Rousseau, Paris) zu verwenden.

Dies Präparat befand sich in einem zugeschmolzenen Glasröhrchen, das in einem sehr dünnen gläsernen Schutzmantel eingeschlossen war. Das Glasröhrchen wurde direkt in die Enzymlösung — ein auf $^1/_{20}$ verdünntes Käselabextrakt von Barnekow in Malmö — eingebracht. Es kamen 5 ccm zur Verwendung. Die Koagulationszeit wurde mit 0,1 ccm gegen 10 ccm Kuhmilch bei 37° bestimmt.

Versuch vom 17. XII. 1903. Nach 15 Stunden Durchstrahlung wird die Koagulationszeit statt $7^1/_2$ Min. zu 9 Min. gefunden.

Versuch vom 18. XII. 1903. Die Koagulationszeit ist nach 8stündiger Bestrahlung von 9 auf 10 Min. erhöht.

Es tritt somit durch Radiumstrahlen eine sichere aber nur sehr schwache Abnahme der Wirksamkeit ein. Trotzdem in den zwei letzten Versuchen die auf die Volumeinheit der durchstrahlten Flüssigkeit berechnete Energiemenge etwa 17 Mal so groß war als in den zwei ersten, wurde keine stärkere Wirkung beobachtet.

Von den Becquerel-Strahlen können, wie bekannt, die α-Strahlen Glas nicht durchdringen, und die Wirkung wäre somit auf die sogenannten β- und γ-Strahlen (die den Kathoden- bzw. Röntgen-Strahlen am nächsten stehenden Strahlen) zurückzuführen.

Indessen bin ich geneigt, das Resultat nicht als eine direkte Wirkung der Becquerel-Strahlen aufzufassen, sondern als eine sekundäre von ultravioletten Strahlen veranlaßte.

---

*) Diese wurde statt Kuhmilch verwendet, um eine scharfe Endreaktion zu erhalten.

Im Dunkeln sieht man nämlich nicht allein im Versuchsröhrchen selbst, sondern auch an nahe stehenden Gegenständen eine kräftige Phosphorescenz. Die ultravioletten Strahlen, welche dadurch an der Innenseite des Versuchsröhrchens — und eventuell auch in der Versuchsflüssigkeit — in kleinen Mengen gebildet werden, reichen vermutlich hin, bei der langen Bestrahlungszeit so kleine Wirkungen, wie die beobachteten, hervorzurufen.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch erwähnen, daß ich in einigen Einzelversuchen beobachtet habe, daß die Röntgenstrahlen (also die den γ-Strahlen am nächsten stehenden) ohne Einfluß auf Chymosin blieben, wenn die Exposition 15 bis 20 Min. dauerte.

XXIV.

Über Fütterungsversuche mit Cholalsäure bei Cystinurie.

Von Dr. **Charles E. Simon** und Dr. **D. G. Campbell.**

Aus dem klinischen Laboratorium von Dr. Charles E. Simon, Baltimore, Md.

Im Anschluß an die älteren Beobachtungen von Kunkel[1]) und Spiro[2]), in welchen nachgewiesen wurde, daß von dem ganzen im Nahrungseiweiß aufgenommenen Schwefel ein bestimmter aliquoter Teil täglich mit der Galle ausgeschieden wird, daß jedoch bei etwa achtfacher Vermehrung des Schwefels in der Eiweißnahrung die Menge des Gallenschwefels nur um das Doppelte steigt, berichtet vor kurzem v. Bergmann[3]) über Versuche, in welchen bei gleichbleibender Kost Cystin verfüttert und die Schwefelausscheidung in der Galle bestimmt wurde. Aus diesen Versuchen, welche an Gallenfistelhunden gemacht wurden, geht hervor, daß die Einführung von Cystin, bei sonst gleichbleibender Nahrung, den Tauringehalt der Galle nicht nachweislich steigert; daß jedoch Fütterung von Natriumcholat neben Cystin eine erheblich erhöhte Schwefelausscheidung durch die Galle bedingt. v. Bergmann folgert, daß im ersten Falle dem Körper jene Menge Cholalsäure fehlt, die nötig wäre, um mit dem etwa gebildeten Taurin zu Taurocholsäure zusammenzutreten. Im zweiten Fall wird diese künstlich geliefert und sekundär wohl auch sekretorisch in erhöhter Menge verfügbar. Da andere schwefelhaltige Körper in der Galle des Hundes wohl kaum vorkommen, und v. Bergmann das gänzliche Ausbleiben der Reaktion auf leicht abspaltbaren Schwefel in seinen Gallenproben konstatieren konnte, so ist wohl auch der Schluß statthaft, daß im Hundeorganismus wenigstens das Cystin in Taurin übergeführt werden kann, und daß speziell das Taurin der Galle aus dem Eiweiß der Nahrung stammt.

Das Ausbleiben einer erhöhten Gallenschwefelausscheidung nach Cystinfütterung, und das positive Resultat bei gleichzeitiger Verabreichung von Cholalsäure, ließen nun vermuten, daß die Cystinurie beim Menschen eventuell auf unzureichender Cholalsäurebildung beruhen könnte. Allerdings müßte man sich dann vorstellen, daß normalerweise eine Taurinbildung primär nicht stattfindet, sondern daß sich eventuell Cystin mit Cholalsäure direkt verbindet, und daß das so entstandene Produkt weiter zu Taurocholsäure oxydiert wird. Andernfalls müßte beim Cystinuriker eine Rückbildung von Taurin zu Cystin stattfinden, die jedoch kaum zu vermuten ist. Der Gedanke an eine Verbindung von Cystin und Cholalsäure ist zunächst wenig bestechend, da wir gewohnt sind, an eine primäre Vereinigung von Taurin und Cholalsäure zu denken. Er ist aber nicht von der Hand zu weisen, und ist auch kürzlich von Blum[4]) ausgesprochen und experimentell begründet worden. Blum schreibt: „Daß aber solche Verbindungen von Cholsäure mit Cystin, bzw. seinen Abkömmlingen existenzfähig sind, ließ sich durch den Versuch zeigen." Durch vorsichtiges Schmelzen äquivalenter Mengen Cholsäure und Cystin erhielt er in der Tat saure, in Eisessig und absolutem Alkohol lösliche Produkte, die starke Schwefelbleireaktion gaben.

Der Versuch, die Cystinurie durch Darreichung von Cholalsäure zum Schwinden zu bringen, erschien demnach nicht unberechtigt. Durch das freundliche Entgegenkommen von Herrn Professor Dr. Osler wurde unser Cystinuriker, über welchen der eine von uns schon anderweitig berichtet hat, in das John Hopkins-Hospital aufgenommen, um so unter genauerer Kontrolle zu stehen, als dies sonst möglich gewesen wäre. Es ist uns eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. Osler auch an dieser Stelle unsern Dank zu sagen.

Die Versuchsperson, ein 40jähriger Mann, Fleischer, befand sich zurzeit in gutem Gesundheitszustande und kam nur behufs Ausführung der mitzuteilenden Versuche ins Spital.

Seine Diät war während der zweiwöchentlichen Versuchszeit konstant und bestand aus 150 g Brot, 30 g Butter, 150 g magerem Schinken, 4 gekochten Eiern plus dem Weißen von 2 Eiern, 175 g magerem Rindfleisch, 100 g Kartoffelbrei, 30 g Reis, 325 ccm Milch, 300 ccm Bouillon, 125 ccm Kaffee und 200 ccm Tee. Die Wasserzufuhr war in keiner Weise beschränkt.

An den drei ersten Tagen erhielt der Mann keine Cholalsäure; am vierten, fünften und sechsten Tag bekam er je 0,6, 0,9 und 1,6 g. Dann folgten drei Normaltage und hierauf fünf Cholalsäuretage, an welchen je 2,0 g verabreicht wurden. Die Dosen am Anfang waren absichtlich klein gewählt, um zunächst

zu ermitteln, wie der Mann die Säure vertragen würde. Allerdings hat Pfaff[5]) festgestellt, daß auch bei länger fortgesetzter Darreichung von gepaarten gallensauren Salzen, in mäßiger Dosis, eine toxische Wirkung beim Menschen nicht stattfindet, jedoch schien uns bei Versuchen mit der Cholalsäure direkt einige Vorsicht geboten. Aus diesem Grunde wurde auch die tägliche Dosis von 2,0 g nicht überschritten. Wir können von vornherein bemerken, daß keine toxischen Symptome beobachtet wurden. Der Mann befand sich während der ganzen Versuchszeit vollständig wohl; nur klagte er über den bittern Geschmack, den er die ganze Zeit im Munde habe, und den er als Grund seines erhöhten Durstes angab. Dies erklärt wohl auch die stark erhöhte Harnausscheidung, die beinahe während der ganzen Versuchsdauer beobachtet wurde. Die Cholalsäure wurde in Form des Natronsalzes in Gelatinekapseln verabreicht.

Im Harn wurde der Gesamtschwefel nach der von Modrakowski[6]) angegebenen Modifikation der Höhnel-Glaser-v. Asbóthschen Methode bestimmt, und der oxydierte Schwefel nach üblicher Weise. Den neutralen Schwefel berechneten wir aus der Differenz. Von einer Bestimmung des leicht abspaltbaren Schwefels, wie sie von Blum und Petry ausgeführt wurde, nahmen wir Abstand, zumal Schulz und Mörner darauf hingewiesen haben, daß bei diesem Verfahren das Cystin nur die Hälfte, eventuell zwei Drittel seines Schwefels abspalten läßt. Im menschlichen Harn brauchten wir auch auf andere neutrale Schwefelkörper weniger Rücksicht zu nehmen, als eventuell bei Versuchstieren notwendig gewesen wäre.

Unsere Resultate sind in der umstehenden Tabelle zusammengestellt.

Beim Überblicken dieser Tabelle fällt sofort die Ungleichheit in der Ausscheidung sowohl des neutralen als auch des oxydierten Schwefels ins Auge. Dies entspricht vollkommen den Beobachtungen von Stadelmann[7]) und v. Bergmann[8]), welche beide die großen Schwankungen in der Gallenschwefelausscheidung betonen. Da beim Cystinuriker die Gallenschwefelausscheidung jedenfalls bedeutend herabgesetzt ist, sind die Schwankungen in der Ausscheidung des neutralen Schwefels im Harne leicht verständlich. Bei uns variierte dieselbe an den Normaltagen zwischen 16,3 und 61,1 Proz. des Gesamtschwefels. Ziehen wir nun den Durchschnitt der Normaltage, so finden wir 33,9 Proz. des Gesamtschwefels im Vergleich zu 24,8 an den Cholalsäuretagen. Zunächst würde dies den Anschein erwecken,

Datum	Tagesmenge in ccm	Spez. Gewicht	Gesamt-Schwefel als $BaSO_4$	Oxydierter-S	Neutral-S	% Neutral-S im Vergleich zum Gesamt-S	Bemerkungen
I 26	Verloren	—	—	—	—	—	—
27	2290	1,015	6,7326	4,8788	1,853	27,4	—
28	1760	1,012	3,8364	2,882	0,9544	24,8	—
29	2500	1,012	4,325	3,82	0,505	11,6	0,6 Cholalsäure
30	1700	1,012	3,9388	3,1008	0,8380	21,2	0,9 „
31	3480	1,009	6,625	3,8562	2,7688	41,7	1,6 „
II 1	3450	1,007	5,1985	3,0994	2,0991	40,3	—
2	3480	1,008	7,3026	2,8362	4,4664	61,1	—
3	3245	1,008	5,1400	4,299	0,8410	16,3	—
4	3250	1,008	4,628	4,410	0,218	4,7	2,0 Cholalsäure
5	3400	1,008	4,2579	2,670	1,5879	36,9	2,0 „
6	4720	1,006	4,049	2,6172	1,4318	35,4	2,0 „
7	3500	1,006	4,928	4,2265	0,7015	14,2	2,0 „
8	4970	1,007	5,9041	3,9412	1,9629	32,9	2,0 „

als ob die Cholalsäure eine Verringerung in der Cystinausscheidung bedingt habe. Wir glauben jedoch kaum, daß dieser Schluß statthaft ist. Gegen eine solche Annahme spricht entschieden die Beobachtung am Ende des sechsten Tages, an welchem trotz Darreichung von Cholalsäure am vierten, fünften und sechsten Tage die Neutralschwefelausscheidung einen höheren Wert, als an den Normaltagen erreicht hatte. Andererseits kam während einer von Cholalsäure freien Periode ein Abfallen des Neutralschwefels zur Beobachtung, von solcher Größe, wie es während der Cholalsäuredarreichung überhaupt nicht stattgefunden hatte. Somit erscheint der Schluß berechtigt, daß bei unserem Cystinuriker die Darreichung von Cholalsäure ohne wesentlichen Einfluß auf die Neutralschwefelausscheidung und wohl auch auf die Cystinausscheidung war. Leicht abspaltbarer Schwefel ließ sich zu jeder Zeit durch intensive Bleischwefelreaktion nachweisen. Wir dürfen nun wohl annehmen, daß beim Cystinuriker entweder die Cystin-Cholalsäuresynthese nicht stattfindet, falls wir uns die Taurocholsäurebildung auf diese Art und Weise vorstellen, oder aber, daß Cystin nicht zu Taurin oxydiert wird, welcher Schluß der älteren Ansicht über Taurocholsäurebildung entsprechen würde. Eine andere Möglichkeit wäre wohl kaum denkbar. Zurzeit ist eine Entscheidung hierüber nicht möglich; jedoch weisen die Versuche Blums darauf hin, daß normalerweise eine Taurocholsäureproduktion durch direkten Zusammentritt von Cystin und Cholalsäure und nachfolgende Oxydation, wie

schon oben bemerkt, nicht auszuschließen ist. Wir könnten in diesem Falle an eine Fermentationsynthese denken, die beim Cystinuriker nicht zustande kommt, oder doch wesentlich eingeschränkt wäre. Untersuchungen in dieser Richtung sind bereits in Angriff genommen.

Literaturverzeichnis.

1) Kunkel, A., Verhandlungen der Königl. sächs. Akademie der Wissenschaften, math.-physik. Klasse 27, 344. Leipzig 1875.

2) Spiro, P., Du Bois Archiv f. Physiol. 22, 714 (1890).

3) v. Bergmann, G., Diese Beiträge 4, 192 (1903).

4) Blum, L., Ibidem 5, 1 (1903).

5) Pfaff, J. und Balch, A. W., Journ. of exper. med. 2, 49 (1897).

6) Modrakowski, Zeitschr. f. phys. Chemie 38, 562 (1903).

7) Stadelmann, E., Zeitschr. f. Biol. 1896, S. 1.

8) v. Bergmann, loc. cit.

XXV.

Über Hemmung der Pepsinwirkung durch Salze.

Von Dr. **Julius Schütz.**

Aus dem Carolinen-Kinderspitale in Wien. (Direktor: Dozent Dr. W. Knöpfelmacher.)

Es ist eine seit langem bekannte Tatsache[1]), daß Enzyme durch verschiedene Mittel in ihrer Wirksamkeit gehemmt werden können. Diese Mittel sind teils physikalischer, vor allem thermischer, teils chemischer Natur. Hierher gehören Säuren, Basen, Alkalien und, wie in letzterer Zeit gezeigt wurde, auch gewisse spezifische, aus dem Tierkörper stammende Substanzen, „Antifermente".

Über die Hemmung der Pepsinwirkung durch Salze liegen eine Reihe älterer Untersuchungen vor[1]). Sie leiden jedoch an dem Umstande, daß die Salze nicht in äquimolekularen Konzentrationen zur Verwendung kamen und die Frage, ob es sich um die Wirkung des Gesamtmolekuls oder um die der Elektrolyte handelte, naturgemäß nicht genügend in den Vordergrund gerückt erscheint.

Ich habe daher, einer Anregung des Herrn Dozenten Pauli entsprechend, dem ich hierfür, sowie für sein stetes Interesse auch an dieser Stelle meinen besten Dank sage, die nachfolgenden Versuche unternommen.

Bei der Hemmung der Pepsinwirkung, wie überhaupt der Wirkung proteolytischer Enzyme durch Salze muß die Frage berücksichtigt werden, ob es sich bei der Hemmung darum handelt, daß das Neutralsalz das Pepsin in irgend welcher Weise ganz oder teilweise in Beschlag nimmt, oder ob das vom Enzym anzugreifende Protein durch das Neutralsalz in irgend welcher Weise verändert und daher der Enzymwirkung weniger zugänglich wird.

Daß letzteres von sehr verschiedenen Seiten her möglich ist, haben vor allem die Untersuchungen W. Paulis[2]) gelehrt. Derselbe zeigte in ausgedehnten Versuchen, daß Salzionen auf Kolloide fällend, fällungshemmend und lösend usw. nach genau festgestellten Gesetzmäßigkeiten einzuwirken imstande sind.

Nun ist es eine in der letzten Zeit ziemlich allgemein angenommene Vorstellung, daß die Grundeigenschaft eines Enzyms seine kolloidale Natur ist. Hat ja Bredig sogar die katalytischen Eigenschaften einer anorganischen Substanz, des Platins, durch Überführung desselben in den kolloidalen Zustand in beträchtlichem Maße zu steigern vermocht.

Zur Beurteilung der Stärke der Pepsinwirkung wurde in den vorliegenden Versuchen die Mettsche Methode benützt.

Betreffs ihrer Verwendbarkeit zu klinischen Zwecken hat sich in der letzten Zeit eine Diskussion erhoben[3]), zu der Stellung zu nehmen hier unnötig ist, weil die dabei gegen die Mettsche Methode erhobenen Einwände sich meist auf Versuchsbedingungen beziehen, wie sie sich beim Arbeiten mit dem ausgeheberten oder ausgepreßten Magensaft naturgemäß ergeben.

Gleichwohl müssen auch beim Arbeiten mit reinen Pepsinsalzsäurelösungen gewisse — wohl ziemlich allgemein bekannte — Kautelen eingehalten werden. Abgesehen von der sorgfältigen Herstellung und Aufbewahrung der Röhrchen[4]) muß darauf geachtet werden, daß die Verdauung des in den Röhrchen eingeschlossenen Eiweiß nicht zu weit geht; denn von einem gewissen, leicht festzustellenden Punkte ab geht die Verdauung nicht mehr proportional der Quadratwurzel aus der Pepsinkonzentration vor sich.

Der Ablesungsfehler läßt sich dadurch einschränken, daß die Ablesung an einer größeren Anzahl von unter gleichen Versuchsbedingungen gehaltenen Röhrchen vorgenommen wird.

Bei Berücksichtigung aller Fehlerquellen ist die Mettsche Methode zu exakten wissenschaftlichen Untersuchungen an reinem Enzymmaterial in hohem Maße verwendbar. Die bei den zu schildernden Untersuchungen angewendete Versuchsanordnung war folgende:

Pepsinsalzsäurelösung von vorher ausprobierter Wirkungsstärke wurde in kleinen Bechergläschen durch Zusatz entsprechender Mengen destillierten Wassers und der betreffenden Salzlösung auf einen Gehalt gebracht, der einer $^1/_{20}$-Normalsalzsäure und einer $^1/_{40}$-, $^1/_{30}$-, $^1/_{20}$-, $^1/_{10}$-, $^1/_4$-Normalsalzlösung entsprach. Die Proben blieben 22 bis 24 Stunden im Brutschrank bei 37 bis 40°. Nach dieser Zeit wurde abgelesen. Da jedes Bechergläschen mit 3 bis 4 Mettschen Röhrchen beschickt war, so sind die erhaltenen Resultate das Mittel aus 6 bis 8 Ablesungen.

Die Salzlösungen kamen in derartigen Verdünnungen zur Verwendung, daß ihre Wirkung infolge der starken Dissoziation nur auf die Ionen und nicht auf die elektrisch neutralen Moleküle zu beziehen ist.

Bei der Wichtigkeit der Salzsäure für die Pepsinverdauung mußten auch Dissoziationsveränderungen derselben durch die zugesetzten Salze in Betracht gezogen werden.

Im Sinne einer Herabsetzung der Salzsäure-Dissoziation und der dadurch veranlaßten Hemmung der Verdauung hätte jedoch

nur der Zusatz der gemeinionigen Chloride wirken können; gerade bei diesen jedoch zeigte sich die Salzhemmung am geringsten ausgesprochen, so daß diese Seite der Salzwirkung von keiner erheblichen Bedeutung für die Versuchsresultate sein kann.

Nachstehend die Tabellen der Hemmungswirkung. Zur Erläuterung der Tabellen diene:

Als Hemmungsgröße ist das Verhältnis der durch Pepsinsalzsäure allein verdauten Eiweißmenge zu der bei Zusatz des betreffenden Salzes verdauten bezeichnet. Wurden z. B. durch Pepsinsalzsäure 4 mm der Eiweißsäure verdaut, bei Zusatz des Salzes nur 1,5, so ist die Hemmungsgröße 4 : 1,5 = 2,66 usw.

Bei jeder einzelnen Versuchsreihe wurde ein Bechergläschen mit Pepsin-Salzsäure allein beschickt und die Hemmungsgröße auf diesen Verdauungswert bezogen.

Versuchsreihe I. Chloride.

	1/40	1/30	1/20	1/10	1/4
Na	1	1,1	1,6	1,8	3,4
K	1	1,1	1,5	1,7	3,4
NH_4	1,1	1,7	1,7	1,7	3,4
Mg	1,1	1,1	1,2	1,7	3,4
Sr	1,2	1,3	1,3	1,8	4,7
Ba	1,2	1,2	1,3	1,6	2,6
Ca	1,2	1,3	1,3	1,7	3,0

Versuchsreihe II. Bromide.

	1/40	1/30	1/20	1/10	1/4
Na	1,5	2,0	2,3	3,5	7,0
K	1,4	1,4	2,0	2,4	7,0
NH_4	1,6	1,7	1,7	3,2	5,3
Mg	1,3	1,4	1,5	2,4	7,0

Versuchsreihe III. Nitrate.

	1/40	1/30	1/20	1/10	1/4
K	1,5	1,8	2,5	3,7	15
Na	1,5	1,8	2,5	10	∞
Mg	1,5	1,7	2,5	3,7	7,5
NH_4	1,5	1,6	1,8	7,5	∞

Versuchsreihe IV. Rhodanide.

	1/40	1/30	1/20	1/10	1/4
Na	4,0	10	20	∞	∞
K	1,1	7,4	10,0	15,0	∞
Mg	2,8	5,0	10,0	20,0	∞
NH_4	1,1	5,0	7,5	15	∞

Versuchsreihe V. Sulfate.

	1/40	1/30	1/20	1/10	1/4
Na	2,5	3,0	7,5	15	∞
K	2,8	3,5	4,6	28	28—∞
Mg	2,8	3,5	—	—	—
NH_4	2,6	2,8	3,5	7,0	14,0

Versuchsreihe VI. Acetate.

	1/40	1/30	1/20	1/10	1/4
K	1,8	2,6	3,2	6,5	∞
NH_4	1,8	1,8	4,0	13	∞
Mg					
Na	1,6	3,1	4,6	15	∞

Versuchsreihe VII. Jodide.

	1/40	1/30	1/20	1/10	1/4
Na	2,2	2,5	3,7	7,5	15,0
K	2,5	3,0	4,2	7,5	15,0
Mg					
NH_4*)	2,2	2,6	2,6	22	∞

In den nachstehenden Übersichtstabellen habe ich die Salze nach der Größe ihrer Hemmungswirkung geordnet.

Die Reihenfolge ist nur bezüglich der weiter voneinander abliegenden Glieder als streng zu bezeichnen, wie dies bei den gegebenen kleinen Messungsfehlern auch nicht anders erwartet werden kann.

*) Die starke Hemmung durch das Ammoniumjodid hat ihren Grund in der Abspaltung von freiem Jod, worauf auch die Gelbfärbung der Lösung hinweist.

I. Reihe der Anionen:

Rhodanide,
Acetate,
Sulfate,
Nitrate,
Jodide,
Bromide,
Chloride.

II. Reihe der Kationen:

Natrium,
Kalium,
Ammonium
Magnesium
Baryum
Calcium
Strontium } wirken ziemlich gleich stark.

Zu Reihe II ist zu bemerken, daß sie nur im allgemeinen gilt, da die Unterschiede in der Hemmungswirkung (wie aus den Versuchstabellen ersichtlich) die Fehlergrenzen nur um unbeträchtliche Werte überschreiten. Die durch eine Klammer verbundenen Kationen stehen zwar alle mit spärlichen Ausnahmen in ihrer Hemmungswirkung dem Na und K nach, doch ließ sich bis jetzt bezüglich ihrer Reihenfolge keine strenge Gesetzmäßigkeit nachweisen. Beim Überblick obiger Daten ergeben sich vorläufig folgende Schlußfolgerungen.

1. Die Anionen wirken innerhalb viel größerer Breite hemmend auf die Pepsinverdauung als die Kationen.

Ähnliche Beziehungen in der Reihenfolge fand Pauli bei der Fällung von Eiweißkörpern durch Salze. Während nämlich bei den Schwermetallsalzen die Natur des Kations für das Fällungsvermögen maßgebend war, entschied bei den Alkali- und Erdalkalimetallsalzen die Natur des Anions.

2. Von den Kationen wirkt Na im allgemeinen am stärksten hemmend.

3. Die Wirkung ist im großen und ganzen eine additive, doch überwiegt der Einfluß des Anions, welcher der Kurve die charakteristische Gestalt verleiht.

4. Der Einfluß der elektrischen Ladung auf das Hemmungsvermögen ist gering, indem z. B. Mg eine annähernd ebenso große Wirkung hat wie Na, K und NH_4 und auch Sr, Ba, Ca nicht auffallend abweichen.

5. Wenn sich nach einer Richtung hin (siehe sub 1) eine Ähnlichkeit zwischen dem Enzymhemmungsvermögen und dem Fällungsvermögen der hier untersuchten Salze ergeben hat, so besteht wieder nach anderen Richtungen hin keinerlei Analogie.

So fallen z. B. in Tafel I die starkfällenden Sulfate und Acetate zwischen die schwachfällenden Bromide und lösenden Rhodanide. Auch stimmt das nichtfällende Ammoniumacetat mit dem fällenden Natriumacetat bezüglich seines Pepsinhemmungsvermögens fast vollkommen überein. Bezüglich der Frage, ob die Hemmungswirkung der Salzionen auf eine Beeinflussung des Enzyms oder des Proteins zu beziehen ist, kann zwar eine vollkommen sichere Entscheidung zurzeit noch nicht getroffen werden, doch hat die erstere Annahme mehr Wahrscheinlichkeit für sich, denn die Versuche sprechen wegen des mangelnden Parallelismus mit den Versuchen Paulis mehr für eine selbständige Wirkung der Elektrolyte auf das Enzym.

Ferner entspricht dieses Resultat auch dem sonstigen Verhalten von Eiweißkörpern gegen so schwache Salzlösungen. Die Zustandsänderungen der Eiweißkörper treten, wenn man von der Globulinlöslichkeit absieht, wenigstens für Neutralsalze der Alkali- und Erdalkalimetalle erst bei bedeutend höheren Konzentrationen ein.

Auch ist die Wirkung auf das Enzym eine stetig mit der Konzentration sich ändernde, während die Zustandsänderung der Eiweißkörper eine unstetige ist (Fällungsgrenze).

Die Untersuchungen werden in mehrfacher Richtung fortgeführt.

Literaturverzeichnis.

1) Siehe Oppenheimer, Die Fermente. 2. Aufl. Leipzig 1903.

2) Pauli, Pflügers Archiv 78, 315 (1899). — Pauli und Rona, Diese Beiträge 2, 1. — Pauli, Diese Beiträge 3, 225. — Pauli, Diese Beiträge 3, 27.

3) Nierenstein und Schiff, Archiv für Verdauungskrankheiten 8. — Kaiserling, Berliner klinische Wochenschrift 1904, Nr. 44. — Heichelheim und Kramer, Münchener medizinische Wochenschrift 1904, Nr. 8.

4) Eine sehr gute Anleitung hierzu findet sich bei Nierenstein und Schiff, loc. cit.

XXVI.

Über die Resistenz von genuinem Eiweiß gegenüber der tryptischen Verdauung im tierischen Organismus.

Von **Siegfried Rosenberg** und **Carl Oppenheimer.**

Aus dem tierphysiologischen Institut der Königl. landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.

Vor kurzer Zeit hat der Eine von uns*) darauf hingewiesen, daß das genuine Pferdeserum eine beträchtliche Resistenz gegen die künstliche tryptische Verdauung besitzt, die sich darin äußert, daß ein erheblicher Anteil des frischen Serums seine Koagulationsfähigkeit durch einen längeren Zeitraum behält. Diese Eigentümlichkeit läßt sich, wie dort des Näheren ausgeführt, nicht restlos durch die Annahme eines im frischen Blute vorhandenen Antitrypsins erklären, sondern fordert die Heranziehung chemischer Vorstellungen über eine in dem Bau des genuinen Eiweißmoleküls selbst begründete Resistenz gegen die Wirksamkeit der käuflichen Trypsinpräparate.

Selbst durch möglichst schonende Vorbehandlung mit schwacher Pepsinsalzsäure wird diese Resistenz sehr erheblich geschwächt.

Die Tatsache der Resistenz der genuinen Eiweißkörper, die sich übrigens nach vorläufigen Versuchen, die der eine von uns bald weiterzuführen hofft, auch am Eierklar zeigt, ist von gewisser biologischer Bedeutung nicht nur für eine etwaige Ausnutzung der genuinen Eiweißstoffe der Nahrung im Organismus, sondern auch vor allem in bezug auf die Frage des Übertritts genuiner Eiweißstoffe in unverändertem Zustande in die Blutbahn durch direkte Resorption aus dem Darm, eine Frage, die zum Verständnis der alimentären Albuminurie sehr wesentlich ist. Während man schon lange wußte, daß parenteral, d. h. mit Umgehung des Darmkanals zugeführte Eiweißstoffe par-

*) Oppenheimer und Aron, Über das Verhalten des genuinen Serums gegen die tryptische Verdauung. Diese Beiträge **4**, 279 (1903).

tiell im Harn wieder ausgeschieden werden, und der eine von uns diese Frage ausführlich behandelt hat*), hat man neuerdings auch die Tatsache konstatiert, daß auch per os gegebene genuine Eiweißkörper unter Umständen in die Blutbahn übergehen können, und dort dadurch nachweisbar sind, daß sie ihre spezifischen Präzipitine erzeugen**).

Diese Reaktion im Blute, die also auf ein Vorhandensein fremder genuiner Eiweißstoffe schließen läßt, tritt nur dann ein, wenn man den Magen mit großen Mengen des Eiweißes überschwemmt. So sahen Michaelis und Oppenheimer Präzipitinreaktion beim Kaninchen dann auftreten, als man dem Tier in 16 Tagen etwa 200 ccm Rinderserum per os eingeführt hatte. Andererseits hatten dieselben gefunden, im Einverständnis mit einer Reihe anderer Autoren, daß Pepsinverdauung sehr schnell die Fähigkeit, Präzipitine zu erzeugen, zerstört. Aus allen diesen Gründen nahm Oppenheimer (loc. cit.) an, daß zum Übertritt genuinen Eiweißes in die Blutbahn eine relative Insuffizienz der peptischen Verdauung die Vorbedingung sein müsse, eine Insuffizienz, die entweder auf einer tatsächlichen Verminderung der peptischen Kraft des Magensaftes, oder auf einer Überschwemmung mit übergroßen, in der Kürze nicht zu bewältigenden Mengen flüssigen Eiweiß beruhen kann.

Wenn aber einmal genuines Eiweiß in den Darm eingetreten ist, scheint die tryptische Verdauung dem Übertritt eines gewissen Bruchteils in die Blutbahn keine allzugroßen Hindernisse mehr in den Weg zu legen. Dieser Gedankengang wird nun durch die oben angezogenen Versuche von Oppenheimer und Aron gestützt, daß tatsächlich ein Anteil des genuinen Serums der tryptischen Verdauung lange hartnäckig widersteht. Dies schien dafür zu sprechen, daß auch im Darm vorhandenes genuines Eiweiß der Pankreasverdauung einen partiellen Widerstand entgegensetzen mag.

Freilich konnte dafür die Verdauung extra corpus keinen vollgültigen Beweis liefern; wir wissen ja heute durch die zahlreichen modernen Arbeiten über den Mechanismus der Pankreasverdauung, daß man durchaus nicht ohne weiteres die künstliche Verdauung mit fertigen Präparaten mit der Wirksamkeit des frischen Pankreassaftes im Darmlumen selbst analogisieren kann. Es konnte sehr wohl der durch die Kinase des Darms

*) Oppenheimer, Über das Schicksal der mit Umgehung des Darmkanals eingeführten Eiweißstoffe im Tierkörper. Diese Beiträge 4, 263 (1903).

**) Michaelis und Oppenheimer, Über Immunität gegen Eiweißkörper. Engelmanns Archiv 1902, Suppl.-B. 336 (dort die weitere Lit.).

aktivierte frische Saft (Pawlow, Delezenne, Hamburger und Hekma*) viel wirksamer sein als das käufliche Trypsin, aus dem nach Vernon**) gerade die wirksamsten Anteile zuerst zerstört werden.

Die Frage konnte nur im Darm selbst, natürlich unter Ausschluß der peptischen Verdauung, entschieden werden.

Die Möglichkeit, solche Versuche anzustellen, bot die von dem einen von uns***) vor einigen Jahren angegebene, selbstschließende Darmfistel. Sie bietet den Vorteil, daß in der versuchsfreien Zeit die Tiere sich völlig normal ernähren, überhaupt den Eindruck ganz gesunder Tiere machen.

Da Rosenberg†) ferner gezeigt hatte, daß die Resorption von leicht angreifbaren Eiweißsubstanzen von dieser Fistel aus sich der normalen sehr nähert, so dürfte man eine Verminderung der Resorption von genuinem Eiweiß tatsächlich auf chemische Resistenz des Serums zurückführen.

Zu unseren Untersuchungen bedienten wir uns einer etwa 7,5 kg schweren Foxterrier-Hündin, an der am 26. VI. 03 die Fisteloperation ausgeführt worden war, und die im August, nach vollkommener Überhäutung der Wunde, in den Versuch genommen wurde.

Bei den Versuchen mußte darauf Rücksicht genommen werden, daß nach Pawlows††) Untersuchungen eine Magensaftsekretion schon durch psychischen Reflex (Erwartung der Fütterung, Anblick und Geruch der Speisen) ausgelöst werden kann, und es mußten Vorkehrungen getroffen werden, den etwa auf diese Weise sezernierten Saft am Eintritt in den Darm zu hindern. Zu diesem Zweck ließen wir abwechselnd mit der zu untersuchenden Eiweißlösung eine Olivenölemulsion in den Darm einlaufen, da nach Lintwarews†††) Untersuchungen Fett vom Darm her einen kräftigen und nachhaltigen Verschluß des Pylorus bewirkt. Um dann noch die direkte Berührung mit dem Sekret der Brunnerschen Drüsen

*) S. darüber Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen. II. Aufl. 1903.

**) Vernon, The conditions of action of the pancreatic secretion. Journ. of Physiol. 28, 375 (1902).

***) S. Rosenberg, Eine Methode zur Anlegung einer selbstschließenden Darmfistel. Pflügers Archiv 85, 149 (1901).

†) S. Rosenberg, Zur Physiologie der Fettverdauung. Pflügers Archiv 85, 152 (1901).

††) Pawlow, Arbeit der Verdauungsdrüsen.

†††) Lintwarew, Über die Rolle der Fette beim Übergang des Mageninhalts in den Darm. Dissertation. Petersburg 1902. Bioch. Zentralbl. I. 184.

auszuschalten, wurde der Einlaufskatheter bis etwa 30 cm unterhalb des Pylorus vorgeschoben; im übrigen war dieselbe Versuchsanordnung beibehalten, wie sie der eine*) von uns bereits bei früherer Gelegenheit angewendet hatte.

Wir lassen nunmehr die Protokolle der Serumversuche folgen:

Am 5. VIII. 03 erhält der Hund Knochen zur Abgrenzung, am 6., 7. und 8. durch die Fistel je 300 ccm schwach hämoglobinhaltiges, zur Konservierung mit $CHCl_3$ versetztes Pferdeblutserum + 20 g Olivenöl emulgiert in 100 ccm einer 1 proz. Sapo medicat.-Lösung, am 9. Knochen zur Abgrenzung.

Dauer des Einlaufs:

am 6. von 10 h bis 12 h. Um 11 h Erbrechen**) von etwas Schleim.
„ 7. von 9¼ h bis 10¾ h. Um 10 h minimales Erbrechen.
„ 8. von 9¼ h bis 11 h. Um 10 h Erbrechen von Schleimspuren.

Der Kot wiegt nach dem Trocknen 39,2 g und enthält 3,6666 g N und 11,0412 g Ätherextrakt. Die Seife enthält 94,04 Proz. Ätherextrakt. Das Serum enthält 0,4925 Proz. Ätherextrakt und 1,4987 Proz. N.

Die Einnahmen an N betrugen demnach	13,4883 g	
Die Ausgabe an N im Kot betrug . . .	3,6666 „	
Die Resorption	9,8217 g	= 72,82 Proz.
Die Einnahme an Fett betrug		
im Öl	60,0000 g	
in der Seife	2,8227 „	
im Serum	4,4325 „	
	67,2552 g	
Die Ausscheidung im Kot	11,0412 „	
Die Resorption	56,2140 g	= 83,58 Proz.

Am 26. VIII. erhielt der Hund Knochen zur Abgrenzung, am 27., 28. und 29. durch die Fistel je 300 ccm von demselben Serum wie im vorigen Versuch + 20 g Olivenöl emulgiert in 100 ccm 1 Proz. Lösung von Sapo medicat., am 30. Fleisch + Kieselsäure zur Abgrenzung.

Dauer des Einlaufs:

am 27. von 9 h 15 bis 11 h 10.
„ 28. von 9 h 20 bis 11 h. Um 10 h geringes Schleimbrechen.
„ 29. von 9 h 15 bis 11 h.

Der Kot ist breiig und wiegt nach dem Trocknen 38,29 g. Da er sich fettig anfühlt, wird er 24 Stunden lang in kaltem Äther extrahiert. Dieser Ätherextrakt enthält 0,13 g N und 10,664 g Fett.

In dem schon einmal extrahierten Kot finden sich dann noch 2,45 g N und 2,3379 g Fett.

Die Einnahme an N betrug	13,4883 g	
Die Ausscheidung im Kot	2,5800 „	
Die Resorption	10,9083 g	= 80,87 Proz.
Die Einnahme an Fett betrug	67,2555 g	
Die Ausscheidung im Kot	15,9019 „	
Die Resorption	51,3536 g	= 76,36 Proz.

*) Rosenberg loc. cit.

**) Da der Eintritt des Erbrechens sich stets vorher durch heftiges Würgen bemerkbar machte, so konnte das Erbrochene allemal quantitativ in vorgehaltene Schalen aufgefangen und durch die Fistel in den Darm zurückgegossen werden.

Am 8. XI. erhält der Hund Hackfleisch + Kieselsäure zur Abgrenzung, am 9., 10. und 11. durch die Fistel je 300 ccm Serum + 20 g Olivenöl emulgiert in 100 ccm 1 proz. Lösung von Sapo medicat.; am 12. Hackfleisch + Kieselsäure zur Abgrenzung.

Der Einlauf dauerte:

am 9. von 9 h 15 bis 11 h 35.
„ 10. von 9 h 40 bis 11 h 45.
„ 11. von 9 h 55 bis 11 h 50.

Der Kot wiegt trocken 17,1 g und enthält 1,6633 g N und 5,6277 g Fett.

Das Serum enthält 1,04 Proz. N und 0,1256 Proz. Ätherextrakt.

Die Einnahme an N betrug . . . . . 9,3600 g
Die Ausgabe im Kot . . . . 1,6633 „
Die Resorption 7,6967 g = 82,23 Proz.

Die Einnahme an Fett betrug
im Öl . . . . 60,0000 g
im Serum . . . . 1,1304 „
in der Seife . . . . 2,5971 „
63,7275 g
Die Ausscheidung im Kot . . . . . . 5,6277 „
Die Resorption 58,0998 g = 91,17 Proz.

Am 20. XII. erhält der Hund Knochen zur Abgrenzung, am 21., 22. und 23. durch die Fistel je 300 ccm Serum + 20 g Olivenöl emulgiert in 100 ccm 1 proz. Lösung von Sapo medicat.; am 24. XII. Knochen zur Abgrenzung.

Der Einlauf dauerte

am 21. von 10 h bis 12 h 20.
„ 22. von 9 h 45 bis 12 h 10. Gleich nach dem Versuch Durchfall.
„ 23. von 9 h 45 bis 12 h 15.

Der Kot wiegt trocken 21,9 g und enthält 1,9348 g N und 6,3176 g Fett.

Das Serum enthält 1,12 Proz. N und 0,232 Proz. Ätherextrakt.

Die Einnahme an N betrug . . . . . 10,0800 g
Die Ausscheidung im Kot . . . . . . 1,9348 „
Die Resorption 8,1452 g = 80,81 Proz.

Die Einnahme an Fett betrug
im Öl . . . . 60,0000 g
in der Seife . . . . 2,5971 „
im Serum . . . . 2,0880 „
64,6851 g
Die Ausscheidung im Kot . . . . . . 6,3176 „
Die Resorption 58,3675 g = 90,23 Proz.

In den bisher geschilderten Versuchen liegt der Resorptionswert für N zwischen 73 und 82 Proz., also merklich unter der Norm. Daß für diese Verminderung der Aufsaugung nicht etwa die Art der Einführung durch die Fistel verantwortlich zu machen ist, das lehren außer einem direkt als Kontrolle angestellten Versuch (s. u.) auch frühere Versuche des Einen*) von uns, die mit

*) Rosenberg loc. cit.

Plasmonlösungen angestellt wurden. Einen*) dieser Versuche, bei dem neben Plasmon auch Olivenöl in Sodalösung emulgiert zur Anwendung kam, lassen wir hier folgen.

2. Versuch.

Gewicht des Hundes 7570 g.

Am 20. I. 01 erhielt das Tier Knochen zur Abgrenzung, am 21., 22. und 23. I. werden je 50 g Plasmon + 50 g Zucker + 12,6 g Olivenöl + 2 g Soda in 500 ccm H_2O gelöst und emulgiert in den Darm gebracht. Die Kanüle ist 25 cm tief eingeführt.

Am 24. I. erhält der Hund Knochen zur Abgrenzung.

Der Einlauf dauert am 21. I. von 9 h 15 bis 1 h. Um 10 h 30 und um 12 h 20 erbricht der Hund etwas gallige, schleimige Flüssigkeit, die sofort durch die Fistel zurückgegossen wird.

Am 22. I. dauert der Einlauf von 9 h 15 bis 1 h und am 23. I. von 9 h bis 1 h.

Der Kot, dessen erste Portion am Morgen des 24. Januar entleert wurde, war fest, geformt und gallig gefärbt. Nach dem Trocknen wog er 20,05 g.

Der Plasmon enthielt an Fett	3,4371 Proz.		
an N.	11,5263 „		
Es waren also eingeführt			
an Fett im Öl	37,8000 g		
im Plasmon	5,1557 „		
Gesamtfett	42,9557 g		
an N	17,2895 „		
Im Kot fand sich an N.	1,1497 „		
Eingenommen waren.	17,2895 „		
Ausgeschieden	1,1497 „		
Resorbiert	16,1398 g		
d. i. = 93,35 Proz.			
An Fett fand sich			
als freies Fett	1,8946 g		
darin saures Fett		1,0444 g	
als Seifenfett	0,8726 „		
Gesamtfett	2,7672 g		
Eingenommen waren	42,9557 „		
Ausgeschieden	2,7672 „		
Resorbiert	40,1885 g		
d. i. = 93,56 Proz.			

Hier also, wo ein leicht zersetzliches Eiweiß durch die Fistel eingeführt war, war dasselbe zu einem nahezu ganz normalen Prozentsatz resorbiert worden.

Es konnte nun noch an die Möglichkeit gedacht werden, daß bei unserem Versuchshunde die Verdauung überhaupt nicht normal war und infolgedessen zu geringe Resorptionswerte gefunden wurden. Daß dies nicht der Fall war, lehren die folgenden Versuche.

*) Rosenberg, loc. cit. S. 167.

Am 13. V. 03 erhält der Hund Hackfleisch + Kieselsäure zur Abgrenzung, am 14., 15. und 16. je 200 g Hackfleisch + 20 Schmalz + 30 Reis, am 17. wieder Hackfleisch + Kieselsäure zur Abgrenzung.

Der Kot wiegt trocken 16,4 g und enthält 1,3532 g N und 2,7956 g Ätherextrakt.

Das Fleisch enthält 3,512 Proz. N und 5,1021 Proz. Fett.

Die Einnahme an N betrug

im Fleisch	21,072	g
im Reis (1 Proz.)	0,900	„
	21,972	g

an Fett

im Schmalz	60,0000	g
im Fleisch	30,6120	„
	90,6120	g

Die Einnahme an N betrug	21,9720	g
Die Ausscheidung	1,3532	„
Die Resorption	20,6188	g = 93,84 Proz.
Die Einnahme an Fett betrug	90,6120	g
Die Ausscheidung	2,7956	„
Die Resorption	87,8164	g = 96,91 Proz.

Es wurde also eine normale Nahrung auch in normaler Weise ausgenützt.

Am 9. VIII. 03 erhielt der Hund Knochen zur Abgrenzung, am 10., 11. und 12. je 300 ccm mittels $CHCl_3$ konserviertes Pferdeblutserum + 20 g Olivenöl, emulgiert in 100 ccm 1proz. Lösung von Sapo medicat. mittels Schlundsonde in den Magen; am 13. Hackfleisch + Kieselsäure zur Abgrenzung.

Der Kot wiegt trocken 20,7 g. Da er sich fettig anfühlt, wird er 24 Stunden lang in kaltem Äther extrahiert; in diesem Ätherextrakt findet man 0,1398 g N und 7,61 g Fett. Der schon einmal extrahierte Kot enthält dann noch 1,2159 g N und 2,3192 g Fett. Das Serum ist dasselbe, wie im ersten Versuch.

Die Einnahme an N betrug	13,4883	g
Die Ausscheidung im Kot	1,3557	„
Die Resorption	12,1326	g = 89,95 Proz.
Die Einnahme an Fett betrug	67,2552	g
Die Ausscheidung	9,9292	„
Die Resorption	57,3260	g = 85,24 Proz.

In diesem Versuch kam wie in den ersten die hemmende Wirkung des Chloroforms auf die Verdauungsenzyme zur Geltung, über die neuerdings wieder Kaufmann*) berichtet hat.

Daß aber der Stickstoff eines nicht mit $CHCl_3$ versetzten und in den Magen gebrachten Serums in normaler Weise aufgesaugt wird, lehrt der nachfolgende Versuch.

*) Kaufmann, Über den Einfluß von Protoplasmagiften auf die Trypsinverdauung. Zeitschr. f. physiol. Chemie 39, 434.

Am 17. II. 04 erhält der Hund Knochen zur Abgrenzung, am 18., 19. und 20. je 300 ccm Pferdeblutserum + 20 g Olivenöl in 100 ccm 1proz. Lösung von Sapo medicat. mittels der Schlundsonde; am 21. Knochen zur Abgrenzung.

Der Kot wog trocken 11,7 g und enthielt 0,6555 g N und 7,2311 g Fett. Das Serum enthielt 0,0744 Proz. Ätherextrakt und 1,1199 Proz. N.

Die Einnahme an N betrug . . .	10,0791 g	
Die Ausscheidung im Kot	0,6555 „	
Die Resorption	9,4236 g	= 93,50 Proz.
Die Einnahme an Fett betrug		
im Öl	60,0000 g	
in der Seife (86,57 Proz.) .	2,5971 „	
im Serum	0,6696 „	
	63,2667 g	
Die Ausscheidung im Kot	7,2311 „	
Die Resorption	56,0356 g	= 88,57 Proz.

Aus den bisher mitgeteilten Versuchen geht zweifellos hervor, daß auch im tierischen Organismus, ganz wie außerhalb desselben Serum, welches nur der tryptischen Verdauung unterliegt, schlechter ausgenutzt wird, wie solches, welches durch peptische Vorverdauung denaturiert wurde. Allein die erhaltenen Resorptionswerte sind doch immer noch ganz beträchtlich, und jedenfalls viel höher, als der Resistenz gegen künstliche Verdauung nach Oppenheimer und Aron entsprechen würde. Für die Erklärung dieser Differenz kommt in Betracht, daß — wie oben schon erwähnt wurde — käufliches Trypsin sicherlich nicht so wirksam ist, wie der noch durch die Galle wirksamer gemachte normale Bauchspeichel; ferner wirkte der Chloroform- und Toluolzusatz, den Oppenheimer und Aron zur Konservierung des Serums für notwendig erachtet hatten, sicher schädigend auf die Trypsinwirkung, wie ja auch in unseren mit chloroformhaltigen Seris angestellten Versuchen diese Schädigung zum Ausdruck kam, worauf oben schon hingedeutet wurde. Endlich aber kann nicht daran gezweifelt werden, daß das in unseren Versuchen in den Darm gebrachte Serum hier — wenigstens teilweise — der Fäulnis unterlag und — auf diese Weise denaturiert — nunmehr bessere Abbaubedingungen darbot.

War diese Auffassung richtig, so mußte vor Fäulnis möglichst geschütztes Serum schlechter resorbiert werden, als in den vorigen gleichartigen Versuchen.

Diese Beschränkung der Fäulnis erreichten wir in den folgenden Versuchen dadurch, daß wir den Einlauf derart beschleunigten, daß in der Minute etwa 7 ccm Flüssigkeit in den Darm eingelassen wurden. Die Folge dieser Darmüberschwemmung war

eine so lebhafte Anregung der Peristaltik, daß jedesmal unmittelbar nach Beendigung des Versuches in wässerigem Durchfall ein großer Teil der eingegossenen Flüssigkeit wieder entleert wurde, so daß ihr Verweilen im Darm nur ein sehr beschränktes war. Während nun aber unter diesen Umständen der Stickstoff aus einer Plasmonlösung zu nahezu 90 Proz. resorbiert wurde, wurde er aus dem Pferdeserum zu kaum 48 Proz. aufgenommen, woraus noch deutlicher, als aus den früheren Versuchen, die Resistenz des genuinen Eiweißes gegenüber dem tryptischen Ferment erhellt.

Die in Rede stehenden Versuche sind folgende:

Am 27. XII. 03 erhält der Hund Knochen zur Abgrenzung, am 28., 29. und 30. je 30 g Plasmon gelöst in 400 ccm Wasser + 20 g Olivenöl emulgiert in 100 ccm 1proz. Lösung von Sapo medicat. durch die Fistel; am 31. Knochen zur Abgrenzung.

Der Einlauf dauerte

am 28. von 9h 45 bis 11h 10. Gleich nach dem Versuch Durchfall.
„ 29. von 9h 40 bis 11h. Gleich nach dem Versuch wässeriger Stuhl.
„ 30. von 10h bis 11h 20. Gleich nach dem Versuch wässeriger Stuhl.

Der Kot wiegt trocken 33,8 g. Da er sehr fetthaltig ist, wird er 24 Stunden lang mit kaltem Äther extrahiert. In diesem Ätherextrakt fand sich 12,6 g Fett und 0,0897 g N. In dem schon einmal extrahierten Kot wurden dann noch 1,0917 g N und 4,3763 g Fett gefunden.

Das Plasmon enthielt 12,713 Proz. N und 0,5046 g Ätherextrakt.

Die Einnahme an N betrug . . .	11,4417 g	
Die Ausscheidung im Kot	1,1814 „	
Die Resorption	10,2603 g	= 89,67 Proz.
Die Einnahme an Fett betrug		
im Öl	60,0000 g	
in der Seife	2,5971 „	
im Plasmon	0,4545 „	
	63,0516 g	
Die Ausscheidung im Kot	16,9763 „	
Die Resorption	46,0753 g	= 73,08 Proz.

Am 25. I. 04 erhält der Hund Knochen zur Abgrenzung, am 26., 27. und 28. durch die Fistel je 300 ccm Serum + 20 g Olivenöl, emulgiert in 100 ccm 1proz. Seifenlösung; am 29. Knochen zur Abgrenzung.

Der Einlauf dauert:

Am 26. von 10h 10 bis 11h 20. Um 10h 50 Erbrechen. Das Erbrochene wird quantitativ zurückgegossen. Gleich nach dem Versuch ganz dünne Entleerung.

Am 27. Einlauf von 9h 50 bis 11h. Um 10h 25 Erbrechen. Das Erbrochene wird in den Darm zurückgegossen. Gleich nach dem Versuch ganz wässerige Stuhlentleerung.

Am 28. Einlauf von 9h 25 bis 11h. Um 10h, 10h 25 und 10h 45 massiges Erbrechen. Das Erbrochene wird durch die Fistel in den Darm zurückgegossen. Gegen Ende des Versuches muß der Hund zur Kotentleerung losgebunden werden. Der Stuhl ist ganz dünn.

Nach dem Trocknen wiegt der Kot 89,8 g und enthält 5,8555 g N und 36,2618 g Fett.

Das Serum enthielt 1,245 Proz. N und 0,104 Proz. Ätherextrakt.

Die Einnahme an N betrug . . .	11,2050 g	
Die Ausscheidung im Kot	5,8555 „	
Die Resorption	5,3495 g	= 47,74 Proz.
Die Einnahme an Fett betrug		
im Öl	60,0000 g	
in der Seife	2,5971 „	
im Serum	0,9360 „	
	63,5331 g	
Die Ausscheidung im Kot	36,2618 „	
Die Resorption	27,2713 g	= 42,82 Proz.

Auffallend ist in diesem Versuch der geringe Wert für die Fettresorption. Doch ist die Erscheinung, daß ein Sinken der Stickstoffausnutzung auch von einem Herabgehen der Fettaufsaugung begleitet wird, nicht neu und erst vor kurzem wieder von Max Voit*) beschrieben worden.

Natürlich zeigt diese schlechte Fettausnutzung, daß bei diesem Versuch die Resorptionsgröße im Darm überhaupt gesunken war, indessen ist trotzdem der Unterschied zwischen der Plasmonausnutzung und der des Serums so groß, daß man diese beiden Versuche noch als Kontrollversuche für die übrigen gelten lassen kann.

Jedenfalls zeigen unsere Versuche, daß auch im tierischen Organismus, — wie außerhalb desselben, — sich genuines Eiweiß resistent gegenüber der tryptischen Verdauung verhält.

Unserem hochverehrten Chef, Herrn Professor Zuntz, danken wir auch an dieser Stelle für sein lebhaftes Interesse an dieser Arbeit.

*) Max Voit, Ausnützungsversuche bei Aufnahme von trockenem und gequollenem Eiweiß mit und ohne Zusatz von Fleischextrakt. Zeitschr. f. Biologie **45**.

XXVII.

Über die Bestimmung des Glycerins im Harn.

Von Dr. **August Herrmann.**

I.

Bei den bisher unternommenen Versuchen, die nach Einverleibung größerer Gaben Glycerins in den Harn übergehende Menge desselben quantitativ zu bestimmen, wurde zunächst die von Rubner gefundene Tatsache verwertet, daß glycerinhaltiger Harn Kupferoxyd proportional der Menge des in ihm enthaltenen Glycerins zu lösen imstande ist.

Da in jedem Harne Substanzen in sehr wechselnder Menge vorhanden sind, welchen diese Fähigkeit zukommt, z. B. Ammonsalze, Harnsäure usw., nahmen die späteren Autoren, welche sich mit diesem Thema befaßten, von einer auf dieser Tatsache aufgebauten Bestimmungsmethode Abstand und versuchten zunächst das im Harne enthaltene Glycerin zu isolieren.

Leo*) bediente sich der Partheil-Törringschen Methode. Nach ihm wird der auf dem Wasserbade eingedampfte Harn mit Alkohol extrahiert, die alkoholische Flüssigkeit mit der gleichen Menge Äthers versetzt. Der nun entstehende voluminöse Niederschlag wird abfiltriert, das Filtrat eingedampft und der Rückstand mit etwas Wasser aufgenommen. Diese wässerige Lösung enthält nun das Glycerin zugleich mit Harnstoff und anderen stickstoffhaltigen Verbindungen. Nun versetzt man die Lösung zur Ausfällung des Harnstoffs mit salpetersaurem Quecksilber, wobei man sukzessive zur Neutralisation der Salpetersäure Natrium bicarbonicum in Substanz zufügt. Dies wird so lange fortgesetzt, bis der Niederschlag dauernd eine intensiv gelbbraune Farbe angenommen hat. Nunmehr wird filtriert, das klare, alkalisch reagierende Filtrat mit Salpetersäure genau neutralisiert und auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird

---

*) Archiv für die gesamte Physiologie **93**, 269. — Berliner klinische Wochenschrift 1902, Nr. 49.

mit Alkoholäther aufgenommen, wobei Natriumnitrat ungelöst bleibt, während das Glycerin in Lösung geht. Der nach dem Verdampfen des Alkoholäthers zurückbleibende Rest wird neuerlich mit wenig Wasser aufgenommen und die wässerige Lösung nach Vermischung mit ausgeglühtem Sand der Destillation im Vakuum bei 180° Außentemperatur unterworfen, und das Destillat mit Permanganat titriert.

Die Ausfällung mit Quecksilbernitrat wird vorgenommen, um zu verhindern, daß das beim Erhitzen auf 180° aus dem Harnstoff und anderen stickstoffhaltigen Bestandteilen entstehende Ammoniak mit überdestilliere, da sonst das Glycerin unter Umständen ganz zersetzt werden könnte.

Nicloux*) scheidet das Glycerin aus dem Harne oder dem Blute in der Weise ab, daß er es durch mehrmaliges Einleiten von Wasserdampf von 100° aus der zu untersuchenden Flüssigkeit in ein gut gekühltes Gefäß übertreibt, wobei sowohl das Entwickelungs- als auch das Aufnahmegefäß jedesmal vor dem Einleiten des Wasserdampfes mit einer Quecksilberluftpumpe evakuiert wird. Diese Operation wird so oft wiederholt, bis eine Probe des Destillates durch 2 Tropfen einer Kaliumbichromatlösung (9,5 g im Liter) unter Zufügung konzentrierter Schwefelsäure dauernd gelb gefärbt wird. Die bleibende Gelbfärbung beweist, daß in der Probe kein Glycerin mehr enthalten und die Austreibung beendet ist.

Die so erhaltene, wie Nicloux meint, nur Glycerin enthaltende Flüssigkeit wird nun mit einer Bichromatlösung nach Zusatz von 10 bis 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure titriert, wobei als Endreaktion der Umschlag der ursprünglich blaugrünen Färbung in Gelbgrün dient. Da die Farbenänderung nicht immer ganz scharf zu erkennen ist, wird zur Kontrolle auch das bei der Reaktion der Glycerinlösung mit dem Bichromat und der Schwefelsäure entstandene Gas mittels einer Quecksilberluftpumpe in ein Eudiometer geleitet und die aufgefangene Kohlensäure, welche proportional ist der Menge des oxydierten Glycerins, gasvolumetrisch bestimmt. Sowohl zum Übertreiben des Glycerins als auch zur Bestimmung desselben hat Verfasser einen eigenen Apparat konstruiert, bezüglich dessen ich auf das Original verweisen muß.

Die Oxydation des Glycerins durch das Bichromat und die Schwefelsäure erfolgt nach Nicloux nur dann vollständig, wenn einerseits das Gefäß, in welchem die Reaktion vor sich geht, in

*) Bulletin de la société chimique, 13. fevrier 1903, ebenso Comptes rendus de la Société de Biologie 26. Octobre 1903 und 21. Novembre 1903.

einem Ölbad von 140° gehalten, und wenn andererseits jede Verdünnung der zur Anwendung kommenden konzentrierten Schwefelsäure vermieden wird. Zu diesem Behufe muß die zu titrierende wässerige Glycerinlösung möglichst durch Eindampfen konzentriert werden.

Wie aus der eben gegebenen kurzen Beschreibung der in der allerneuesten Zeit zur Glycerinbestimmung im Harne angewandten Methoden ersichtlich ist, muß in allen Fällen die Glycerinlösung eingedampft werden und zwar nach Leo*) mehrere Male, nach Nicloux**) wenigstens einmal. Da das Glycerin mit Wasserdämpfen flüchtig ist, so müssen bei der quantitativen Bestimmung desselben nach diesen Methoden Verluste eintreten. Die Größe dieser Verluste ist in erster Reihe abhängig von der Dauer des Eindampfens und wird von den Autoren verschieden angegeben.

Wenn ich von 25 ccm einer 3,2proz. Glycerinlösung 5 ccm abdestillierte, so enthielt das Destillat, nach dem später zu schildernden Zeisel-Fantoschen Verfahren behandelt, 2 mg Glycerin. Wurden von derselben Menge 20 ccm abdestilliert, so waren im Destillat 5 cg enthalten.

Moritz***) gibt an, daß eine wässerige Glycerinlösung durch einstündiges Trocknen im Wassertrockenkasten einen Verlust von 0,5 Proz. erleidet und daß, wenn man dieselbe Glycerinlösung der gleichen Behandlung unterzieht, welche für den Wein bei der Glycerinbestimmung nach dem Reichsverfahren vorgeschrieben ist, der Totalverlust 5,9 Proz. beträgt.

Neßler und Barth†) berechnen die Flüchtigkeit des Glycerins beim Eindampfen auf 10,6 Proz., die Flüchtigkeit desselben beim Trocknen auf 4,4 Proz., so daß der Gesamtverlust etwa 15 Proz. erreicht.

Zeisel und Fanto††) geben den Gesamtverlust des Glycerins bei der Bestimmung desselben im Weine nach dem Reichsverfahren in einem Falle gar mit 27,3 Proz. an.

Jedenfalls lassen diese Angaben, so sehr sie auch bezüglich der Menge des Verlustes untereinander differieren, die Genauigkeit einer Bestimmungsmethode des Glycerins, mit welcher ein ein- oder mehrmaliges Abdampfen verbunden ist, als eine recht mangelhafte erscheinen.

---

*) loc. cit.
**) loc. cit.
***) Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte **5**, 349.
†) Fresenius' Zeitschrift **21**, 43.
††) Fresenius' Zeitschrift **42**, 575.

Leo gibt selbst an, daß seine Methode zweifellos mit Verlusten verbunden ist und ebenso sind auch gegen die Nicloux sche Methode und deren Resultate sehr bald nach der Publikation derselben Einwürfe erhoben worden*).

In jüngster Zeit haben nun Zeisel und Fanto**) eine Methode der Glycerinbestimmung angegeben, bei welcher ein Eindampfen der zu untersuchenden Flüssigkeit nicht notwendig ist, so daß der dadurch verursachte Fehler vermieden wird.

Das Zeisel-Fantosche Verfahren beruht darauf, daß das Glycerin unter der Einwirkung kochender wässeriger Jodwasserstoffsäure in flüchtiges Jodalkyl umgewandelt wird, dessen Dampf, von begleitendem Jod und Jodwasserstoff befreit, in alkoholische Silberlösung eintritt. Mit dieser setzt es sich zur äquivalenten Menge Jodsilber um, welch letzteres gewogen wird.

Ich gebe die Beschreibung der Methode, welche von den Autoren Jodidverfahren genannt wird, der Kürze wegen nach dem Referate des chemischen Centralblattes 1902, I, 1424 wieder, muß jedoch jedem, welcher diese Methode zur Anwendung bringen will, dringend empfehlen, die Originalpublikationen einzusehen, da genaue Resultate nur durch peinliche Einhaltung der detaillierten Vorschriften erzielt werden können.

Zur Ausführung ist ein besonderer Apparat erforderlich, welcher von Paul Hack, Wien IX/3, gefertigt wird und welcher das Übertreiben des aus dem Glycerin gebildeten Isopropyljodids gestattet. In das Kochkölbchen des Apparates mißt man 5 ccm der Glycerinlösung, fügt ein Stückchen unglasierten Tones oder Bimssteins, sowie 15 ccm wässerige Jodwasserstoffsäure zu, welche eine Dichte von 1,9 haben muß. Man setzt das Kölbchen an den Apparat, beginnt gleichzeitig mit dem Durchleiten von Kohlensäure (3 Blasen in der Sekunde) und destilliert bei mäßigem Sieden unter Benutzung des Glycerinbades. Das Destillat passiert einen auf 60 ± 10° erwärmten Lauwasserkühler, wird in einem zu 1/3 mit einer Aufschlämmung von amorphem, rotem Phosphor gefüllten, ebenfalls auf 60° erwärmten Blasenzähler von den mitgehenden Jod- und Jodwasserstoffdämpfen befreit und gelangt in einen mit 45 ccm alkoholischer Silberlösung (40 g geschmolzenes Silbernitrat werden in 100 ccm Wasser gelöst, mit absolutem Alkohol auf 1 Liter gebracht und nach 24 Stunden, evtl. auch vor dem Gebrauch filtriert) beschickten Erlenmeyerkolben, in dem die Umsetzung des Isopropyljodids zu Silberjodid erfolgt. Zur Sicherheit ist noch ein zweites kleines, mit 5 ccm Silberlösung beschicktes Kölbchen vorgelegt. Die Dauer der Destillation ist abhängig von der Intensität des Siedens, der Temperatur des Kühlwassers, der Geschwindigkeit des Gasstroms und der Natur der Substanz und nimmt etwa 2 bis 4 Stunden in Anspruch.

---

*) Mouneyrat, Comptes rendus de la Société de Biologie. 26. Octobre 1903 und 21. Novembre 1903.

**) Zeitschrift für das Landwirtschaftliche Versuchswesen in Österreich 5, 729 und ebenso Fresenius' Zeitschrift 42, 549.

Es empfiehlt sich, die für die einzelnen Objekte erforderliche Zeit durch Vorversuche festzustellen und das Ende der Destillation durch Auswechseln der Auffangflasche zu kontrollieren. Nach beendeter Destillation bringt man den Inhalt der Vorlage in ein Becherglas, verdünnt auf etwa 450 ccm, gibt 10 bis 15 Tropfen verdünnter Salpetersäure dazu, läßt auf dem Wasserbade heiß werden, filtriert das dadurch gut filtrierbar gewordene Jodsilber mittels Saugpumpe durch ein Asbestfilterröhrchen und trocknet den Niederschlag nach dem Auswaschen mit Wasser und Alkohol bei 120 bis 130° oder auch über kleiner Flamme unter Durchsaugen von Luft. Den Inhalt der kleineren Vorlage vereinigt man nur dann mit dem der ersten, wenn nach dem Verdünnen mit der 10fachen Menge Wasser Trübung eintritt. Das gefundene Silberjodid mit 0,3992 multipliziert ergibt die vorhandene Glycerinmenge. Zugabe von amorphem Phosphor in den Kochkolben ist wegen der Bildung von Phosphorwasserstoff nicht zu empfehlen. Der rote Phosphor ist durch Waschen mit Schwefelkohlenstoff, Äther, Alkohol und Wasser zu reinigen. Zu je einer Füllung des Blasenzählers genügen 0,5 g, die für viele Bestimmungen ausreichen.

Merkliche Mengen von Schwefelverbindungen, Alkohole, Ester und Äther, soweit sie mit wässerigem Jodwasserstoff flüchtige Jodide liefern, stören die Bestimmung und müssen, soweit dies ausführbar ist, vorher entfernt werden.

Die von Zeisel und Fanto mitgeteilten Beleganalysen sind sehr befriedigend. Auch die von mir nach dieser Methode ausgeführten Analysen ergaben gute Resultate.

Durch Auflösen einer gewogenen Menge von Glycerinum bidestillatum Merck, dessen spez. Gewicht mit der Westphalschen Wage zu 1,236 festgestellt wurde, stellte ich mir eine wässerige Lösung dar, welche nach der Gehaltsbestimmung von Lenz*) auf Grund des spez. Gewichts in 5 ccm 0,1635 g wasserfreies Glycerin enthalten mußte. Je 5 ccm dieser Lösung dem Jodidverfahren unterworfen, ergaben in zwei Versuchen 0,1628 und 0,1624 g Glycerin.

II.

Als ich das bei wässerigen Glycerinlösungen so befriedigende Bestimmungsverfahren auf in Harn gelöstes Glycerin anwandte, zeigte sich ein großer Übelstand. Wenn auch aus dem Harn, wie dies Zeisel und Fanto bei der Bestimmung des Glycerins im Weine verlangen, die Sulfatschwefelsäure durch Chlorbaryum entfernt worden war, so trat doch bei der Behandlung des sulfatfreien Harns mit kochender Jodwasserstoffsäure Schwefelwasserstoff auf, wie sich leicht an einer mehr oder weniger starken Schwärzung einer an Stelle des Silbers vorgelegten Bleiacetatlösung erkennen ließ**).

*) Fresenius' Zeitschrift 19, 302.

**) Es erscheint mir nicht überflüssig, an dieser Stelle auch zu bemerken, daß in manchen Fällen auch die auf Empfehlung von Zeisel und Fanto

Bei dem regelrecht durchgeführten Jodidverfahren erzeugte der mit etwas Schwefelwasserstoff gemengte Isopropyljodiddampf in der Silberlösung neben Jodsilber auch den schwarzen Niederschlag von Schwefelsilber.

Die so aufgetretene Schwärzung ist nicht gleichzusetzen dem von mir ebenso wie von Zeisel und Fanto beobachteten braunen Beschlage an der Innenseite des Röhrchens, welches in die Silberlösung eintaucht. Dieser Beschlag stammt von der Phosphoraufschwemmung und ist auch bei Beobachtung aller von den Autoren und von Stritar*) angegebenen Kautelen nicht völlig zu vermeiden. Dieser Niederschlag ist sehr spärlich, fast unwägbar, so daß durch ihn die Wägung des Jodsilbers in keiner Weise beeinflußt wird. Anders verhält es sich mit dem aus dem Schwefelwasserstoff entstehenden Schwefelsilber. Der Schwefelwasserstoff bildet sich beim Kochen des Harnes mit Jodwasserstoffsäure durch Reduktion der nach Ausfällung mit Chlorbaryum darin noch verbleibenden schwefelhaltigen Verbindungen; je nach deren Menge kann das Schwefelsilber unter Umständen eine genaue Bestimmung des gebildeten Jodsilbers vereiteln.

Es handelte sich also zunächst darum, diese Störung zu beseitigen.

Als ich versuchte, den Isopropyljodiddampf vom Schwefelwasserstoff in der Weise zu befreien, daß ich das Dampfgemenge durch eine Röhre leitete, welche mit vorher geglühtem Kupfervitriolbimsstein gefüllt war, wurde zwar der Schwefelwasserstoff gebunden, ich erlitt jedoch auch Verluste an Isopropyljodid wohl aus dem Grunde, weil ein Teil des letzteren in dem porösen Bimsstein festgehalten wurde.

Ich erreichte jedoch meinen Zweck vollkommen, wenn ich den schwefelwasserstoffhaltigen Isopropyljodiddampf durch eine kleine, mit etwa 5 ccm einer 5proz. Natriumarseniatlösung beschickte Peligotröhre leitete.

Diese Peligotröhre wurde in den Zeisel-Fantoschen Apparat zwischen den mit der Phosphoraufschwemmung gefüllten Blasenzähler und das in die alkoholische Silberlösung eintauchende Röhrchen eingeschaltet, durch gute Glasschliffe gedichtet und zusammen mit dem Blasenzähler in Wasser von 60° gehalten. In der Peligotröhre setzte sich der Schwefelwasserstoff zu Arsensulfür um, während andererseits, trotz des etwas weiteren Weges, welchen der Isopropyljodiddampf in dem so vervollständigten Apparat

---

von Kahlbaum in Berlin bezogene Jodwasserstoffsäure vom spez. Gewicht 1,9 beim Kochen Spuren von Schwefelwasserstoff entwickelte.

*) Fresenius' Zeitschrift 42, 586.

nehmen mußte, ein Verlust an letzterem nicht eintrat. Dies bewies der nachfolgende Versuch:

5 ccm einer ätherischen Isopropyljodidlösung ergaben, als die Lösung im Kochkölbchen erhitzt und die Dämpfe unter Durchleiten von Kohlensäure durch den Zeiselschen Apparat getrieben wurden, in der vorgelegten Silberlösung 0,461 g Silberjodid. 5 ccm derselben ätherischen Lösung ergaben unter denselben Bedingungen durch den Zeiselschen Apparat und die von mir zugefügte Peligotröhre geleitet 0,4605 g Silberjodid.

Es mußte zu dieser Probe eine ätherische und nicht eine weingeistige Lösung des Isopropyljodids angewandt werden, weil der Alkohol bei der Destillation in der wässerigen Phosphoraufschwemmung zurückgehalten wurde und die verdünnte weingeistige Füllung des Blasenzählers auch das Isopropyljodid zurückgehalten hätte.

Wie einige am Schlusse anzuführende Beleganalysen zeigen werden, gelingt es nach Einschaltung einer mit Natriumarseniat beschickten Peligotröhre in den Zeisel-Fantoschen Apparat dem Harne zugefügtes oder nach der Einführung per os in den Harn übergehendes Glycerin mit dem Jodidverfahren genau zu bestimmen.

Ich muß jedoch noch eines wichtigen Umstandes Erwähnung tun. Zahlreiche von mir angestellte Versuche ergaben, daß jeder normale und pathologische Harn, auch wenn den betreffenden Personen vorher kein Glycerin eingegeben worden war, in der Menge von 5 ccm dem Jodidverfahren unterworfen, in der alkoholischen Silberlösung eine Opaleszenz oder auch die Bildung einer kleinen Menge eines weißen, später gelbwerdenden Niederschlages hervorruft. Dieser minimale Niederschlag ist durchaus nicht zu verwechseln mit dem schon oben erwähnten, auch beim Blindversuche auftretenden braunen Beschlage des eintauchenden Röhrchens, sondern ist dem ganzen Aussehen und Verhalten nach Silberjodid.

Die Menge des aus solchen Harnen erhaltenen Silberjodids schwankt für 5 ccm je nach den Individuen, von welchen der Harn stammt, von einigen Zehntel Milligramm bis, wie ich allerdings nur in einem Falle von Diabetes mellitus beobachten konnte, zu 1,8 cg. Das sind im Verhältnis zu der Menge von Jodsilber, welche man aus dem Harne von Individuen erhält, bei welchen per os gegebenes Glycerin in den Harn übertrat, sehr geringe Mengen, aber auf die Tagesmenge Harn berechnet ergeben sie doch Werte, welche nicht vernachlässigt werden dürfen. Bei einem und demselben Individuum bleibt die auf die Tagesmenge nach dem Jodidverfahren entfallende Menge Jodsilber, eine ziemlich gleichmäßige Lebensweise vorausgesetzt, fast unverändert. Bei mir selbst erhielt ich an zwei Tagen, an denen etwa 5 bis 6 Eier und 1/2 Liter Wein genossen wurden, für die Tages-



menge 1,08 g und 1,013 g Jodsilber. In einer anderen Periode, wo der Genuß von Wein und Eiern völlig vermieden wurde, an drei aufeinander folgenden Tagen 0,18, 0,15 und 0,17 g Jodsilber in der Tagesmenge.

Für eine ganz genaue Bestimmung der Menge des in den Harn übergegangenen Glycerins ist es sonach wünschenswert, die Jodsilberausscheidung des vorhergegangenen Normaltages nach dem Jodidverfahren zu ermitteln, und von der Menge des am Glycerintage erhaltenen Jodsilbers abzuziehen, ferner an beiden Tagen eine möglichst gleichmäßige Nahrung einzunehmen.

Welchem Körper oder, wenn es mehrere sein sollten, welchen Körpern das Auftreten des Silberjodidniederschlages im Harne von Personen, denen kein Glycerin gereicht wurde, zuzuschreiben ist, wage ich nicht zu entscheiden. Ich möchte in dieser Beziehung nur nachstehendes bemerken: Der Silberjodidniederschlag wird durch das Zeisel-Fantosche Verfahren auch erhalten bei Harnen, welche vorher zur Trockne eingedampft wurden, allerdings in etwas geringerer Menge. Er kann also flüchtigen Alkoholen, Ketonen u. dgl., welche etwa aus der Nahrung in den Harn übergehen, nicht zugeschrieben werden. Er bleibt der Menge nach vollkommen ungeändert, wenn der Harn vorher mit neutralem Bleiacetat, mit Phosphorwolframsäure oder Tanninlösung ausgefällt worden war.

Das Auftreten eines Jodsilberniederschlages unter den gegebenen Bedingungen ist eine Reaktion, welche ausschließlich der Alkylgruppe zukommt. Von Körpern dieser Gruppe ist bisher im normalen Harne nur das Glycerin nachgewiesen worden (Sotnischewsky*), und zwar nur als Zersetzungsprodukt der im Harne normalerweise vorkommenden Glycerinphosphorsäure. In der Tat wird das Glycerin der Glycerinphosphorsäure durch das Jodidverfahren quantitativ bestimmt. Aus einer abgewogenen Menge vorher getrockneten glycerinphosphorsauren Calciums erhielt ich 97 Proz. des Glycerins, welches der Rechnung nach darin enthalten sein sollte, wobei ich noch bemerke, daß das Präparat nicht ganz rein war, sondern auch etwas Schwefelsäure enthielt.

Berechnet man den von mir in normalen und pathologischen Harnen ohne vorhergegangene Glycerinzufuhr bestimmten Silberjodidniederschlag auf Glycerin, so würde sich eine tägliche Glycerinausscheidung von etwa 0,1 bis 1,5 g auf die Tagesmenge ergeben. Diese Menge ist viel zu groß, als daß sie den im Harne vorhandenen glycerinphosphorsauren Salzen allein zugeschrieben werden könnte. Man müßte also annehmen, daß, falls der Silber-

*) Zeitschr. f. physiolog. Chemie 4, 214.

niederschlag nur dem im Harne enthaltenen Glycerin seinen Ursprung verdankt, auch nicht gepaartes Glycerin im Harne vorkommt.

Schon Zuelzer*) spricht von der Möglichkeit einer Spaltung der leicht zersetzlichen glycerinphosphorsauren Salze bei längerem Verweilen derselben in der Harnblase. Um die üblichen sicheren qualitativen Proben des Glycerins, so Acroleinbildung bei trockener Destillation desselben mit saurem schwefelsaurem Kali oder Grünfärbung der Flamme beim Erhitzen mit Borax am Platindraht, vorzunehmen, wäre es notwendig, das Glycerin aus dem Harne rein darzustellen. Dieser Versuch ist mit Rücksicht auf die sehr geringen im Harne eventuell enthaltenen Mengen als aussichtslos zu betrachten und so kann das Auftreten des Silberjodids bei Durchführung des Jodidverfahrens mit normalem Harne nur mit Vorsicht als Beweis für das Vorhandensein kleiner Mengen freien Glycerins verwertet werden. Ist ja doch diese Reaktion, wie schon bemerkt, einer ganzen Gruppe von Körpern eigen und nicht dem Glycerin allein.

Ich gebe zum Schlusse einige Beleganalysen.

1. a) 5 ccm einer Glycerinlösung ergaben Jodsilber 0,4008 g, also Glycerin 0,1579 g.
   b) 5 ccm Harn eingedampft ergaben Jodsilber 0,0105 g, auf Glycerin berechnet 0,0041 g.
   c) 5 ccm desselben Harns eingedampft plus 5 ccm derselben Glycerinlösung ergaben 0,4133 g Siberjodid, also Glycerin 0,1621 g.
2. a) 5 ccm eines anderen Harns ergaben Silberjodid 0,0067 g, auf Glycerin berechnet 0,0026 g.
   b) 5 ccm dieses Harns plus 5 ccm der obigen Glycerinlösung (a) ergaben 0,4057 g Silberjodid, also Glycerin 0,1591 g.
3. a) 2 ccm einer frisch bereiteten Glycerinlösung ergaben 0,1574 g Silberjodid, also Glycerin 0,0617 g.
   b) 2 ccm dieser Glycerinlösung plus 5 ccm Harn ergaben nach Abzug des in 5 ccm Harn entstandenen Silberjodidniederschlages von 0,076 g eine Glycerinmenge von 0,0615 g.
   c) 2 ccm derselben Glycerinlösung ergaben mit 5 ccm eines anderen Harns, welcher für sich allein 0,0114 g Silberjodid lieferte, nach Subtrahierung dieser Menge einen Silberjodidniederschlag von 0,1578 g, was einer Glycerinmenge von 0,0619 g entspricht.

Diese Resultate müssen, besonders mit Rücksicht auf das komplizierte Verfahren, als sehr befriedigend betrachtet werden.

Fasse ich die Ergebnisse der im vorstehenden niedergelegten Beobachtungen zusammen, so muß ich sagen:

1. Das Zeisel-Fantosche Verfahren gibt in der oben angegebenen Modifikation, welche die Reinigung des entstehenden

*) Untersuchungen über die Semiologie des Harns. Berlin 1884, S. 20.

Isopropyljodids vom mitauftretenden Schwefelwasserstoff ermöglicht, zur Bestimmung des im Harne gelösten Glycerins gute Resultate.

2. Bei der Bestimmung der Menge des nach Einverleibung per os in den Harn übergehenden Glycerins ist zu beachten, daß auch im Harne von Personen, welche kein Glycerin erhielten, bei der Durchführung des Jodidverfahrens kleine Mengen Silberjodids auftreten. Bei ganz genauen Bestimmungen ist es wünschenswert, die Menge dieses Silberjodidniederschlages in dem Harne des der Glycerindarreichung vorangehenden Tages zu ermitteln und von der Menge des am Glycerintage erhaltenen Silberjodids abzuziehen.

Mit der Anwendung der eben geschilderten Methode zur Lösung einiger physiologisch-chemischen Fragen bin ich beschäftigt und hoffe in einiger Zeit über das Ergebnis berichten zu können.

Karlsbad, April 1904.

XXVIII.

Zur Frage der physiologischen Bedeutung der Kolloide.

Von **Rudolf Höber** und **Dora Gordon.**

Aus dem physiologischen Institut der Universität Zürich.

Bei den Physiologen spielen momentan die Kolloide eine große Rolle, teils weil die Fermente und die Eiweißkörper zu ihnen gehören, teils deshalb, weil die Ionen, deren Wirkungen auf den Organismus eben besonders eifrig studiert werden, den Zustand der Kolloide stark zu beeinflussen vermögen; in dieser Hinsicht knüpft das Interesse wohl vornehmlich an Loebs Experimente an, durch die zum ersten Male nachgewiesen wurde, daß, genau so wie die Fällbarkeit vieler Kolloide, auch die physiologische Funktionsfähigkeit bestimmter lebender Objekte unter der Abhängigkeit von Ladungssinn und Wertigkeit von Ionen steht. Ich erinnere vor allem an Loebs bekannte Versuche an Funduli und Fundulus-Eiern, bei denen sich zeigte, daß beinahe beliebige zweiwertige Kationen in ihrem Einfluß auf den Organismus einander vertreten können, ebenso die dreiwertigen Kationen. Ganz analog äußert sich die Wirksamkeit der Ionen an den Cilien der Larven von Arenicola; nach den Angaben von Lillie*) wird die intensive Schädigung, die reine Kochsalzlösung an ihnen hervorbringt, vermindert durch kleine Mengen der zweiwertigen Kationen von Ca, Mg, Mn, Fe, Co, Ni, Cd, Pb, Zn, Cu, U und durch noch kleinere Mengen der dreiwertigen Kationen von Al, Cr und Fe. In diesen Fällen ist die Beziehung zu den Erscheinungen an den kolloidalen Lösungen ganz offenbar; in anderen tritt allerdings der Einfluß von Ladungssinn und Wertigkeit auf die normale Funktion nicht so deutlich hervor. So z. B. geraten nach Loebs Angaben**) Froschmuskeln in den Lösungen von Salzen der einwertigen Kationen

---

*) American Journ. of Physiol. **10**, 419 (1904).

) Festschr. f. Fick 1899, S. 101. — Pflügers Archiv **91, 248 (1902). — Decennial publications of the Univ. of Chicago 1902.

Na^+, Li^+, Rb^+, Cs^+ in rhythmische Tätigkeit, nicht aber in Kalisalzlösungen, und die rhythmische Tätigkeit wird gehemmt durch Salze mit den zweiwertigen Kationen von Ca, Mg, Sr, Be, Co, Mn, aber nicht durch Ba-, Zn-, Cd-, Pb-Salze. Ähnliche Abweichungen vom „Gesetz" des Einflusses von Ladungssinn und Wertigkeit der Ionen kommen mehrfach vor; ich erinnere z. B. an die Versuche von Loeb*) über Reizung sensibler Nerven durch Ionen und an die Versuche von Maccallum**) über die Erregung der Peristaltik. Aber diese „Ausnahmen" können die Bedeutung des bei Fundulus und Arenicola Gefundenen nicht mindern; sie beweisen nur, daß die Ionen nicht bloß kraft ihrer Elektrizitätsladung und kraft deren nicht bloß auf die Kolloide wirken, sondern daß außerdem die Träger der Ladungen, die chemisch verschiedenen Substanzen, ihre spezifischen Wirkungen auf alle möglichen Stoffe entfalten, die eventuell viel prägnanter hervortreten, als die allein von den Ladungen abhängigen Wirkungen auf die Kolloide, sodaß diese unter Umständen ganz in den Hintergrund gedrängt werden können. Dafür liefern die Versuche von Herbst***) massenhaft Beispiele. Aber deshalb sind natürlich die Beziehungen zwischen Ionen und Kolloiden keineswegs irrelevant. Es ist überhaupt einfach gar nicht anders möglich, als daß die Elektrolyte auf den Organismus zum Teil durch den Einfluß auf seine Kolloide wirken; sogar die allererste Stelle, an der Ionen mit dem lebendigen Organismus in Berührung kommen, ist ein Ort, an dem sie durch Kolloidbeeinflussung auf ihn wirken; die Stelle ist die aus Kolloiden aufgebaute Plasmahaut. Es kann seit den soeben von dem einen von uns veröffentlichten Untersuchungen†) über Ionenpermeabilität kaum noch ein Zweifel darüber bestehen, daß die Ionen auf die Plasmahaut-Kolloide einwirken, und es kann auch nicht zweifelhaft sein, daß dieser Einfluß eventuell durch Änderung der Permeabilitätsverhältnisse der Plasmahaut von großer Bedeutung für den Stoffwechsel sein kann. Möglicherweise ist diese Alteration aber auch noch in einer anderen Beziehung von Wichtigkeit.

Ein lebender Organismus gerät in Tätigkeit durch Reizung; der sinnenfällige Erfolg der Reizung ist eine Reaktion. Die Reizursachen, wenigstens die äußeren Reizursachen kennen wir vielfach (Druck, Ätherwellen usw.), ebenso vielfach die Reizerfolge

*) Pflügers Archiv **91**, 248 (1902).
**) University of California Publications 1903, S. 5.
***) Archiv f. Entwickelungsmechanik **17**, 306 (1904).
†) Pflügers Archiv **101**, 607 (1904) und **102**, 196 (1904).

(Kontraktion, Sekretion usw.); zwischen beiden liegt eine ganze Kette von im wesentlichen unbekannten Vorgängen; den primären, den ersten, der sich an der lebenden Zelle abspielt und der den Anstoß, die Auslösung für die folgenden in der Kette darstellt, nennen wir Erregung. Was ist das für ein Vorgang? Sicher ist das nicht mit wenigen Worten zu sagen, sicher kann Erregung auf sehr verschiedene Weise zustande kommen. Ein Lichtstrahl, der ins Innere der Zelle eindringt, kann dort irgendwo eine photochemische Reaktion veranlassen, Wärmezufuhr kann den Stoffwechsel irgendwo zuerst abändern. Aber eigentlich liegt es in der Natur der Organisation, daß der Teil des lebenden Organismus, der am äußersten liegt, vielfach von einem äußeren Reiz auch am ersten getroffen und verändert wird, und das ist die Plasmahaut. Alteration der Plasmahaut kann also Anstoß, Auslösung, Erregung sein; Erregbarkeit oder wenigstens eine Art Erregbarkeit würde dann Alterationsfähigkeit der kolloidalen Plasmahaut bedeuten.

In einem gedankenreichen Artikel*): „Zur Theorie der elektrischen Reizung" setzt Nernst auseinander, daß für das Zustandekommen einer elektrischen Reizung eigentlich die einzige Möglichkeit in der Einwirkung von Ionen auf die halbdurchlässigen Membrane des Organismus gelegen ist. Er schreibt:

„Es ist bekannt, daß im organisierten Gewebe die Zusammensetzung der wässerigen Lösung, die den elektrolytischen Leiter bildet, nicht überall die gleiche ist, und insbesondere ist sie innerhalb und außerhalb der Zellen verschieden. Halbdurchlässige Membrane verhindern den Ausgleich durch Diffusion; nur an diesen Membranen können Konzentrationsänderungen durch den Strom erzeugt werden, während bekanntlich im Innern einer Lösung von überall gleicher Zusammensetzung der Strom eine solche Wirkung nicht hervorbringen kann, weil in jedes Volumelement in jedem Augenblick ebensoviel Ionen hinein- wie hinauswandern.

An den halbdurchlässigen Membranen hingegen müssen Konzentrationsänderungen auftreten, weil der Strom daselbst Salz hintransportiert, dessen weiteren Transport die Membran verhindert. Salze, welche die Membran zu passieren imstande sind, übernehmen die Stromleitung durch die Membran. Hier also ist offenbar der Sitz der elektrischen Reizung zu suchen**)."

---

*) Nachr. der Kgl. Ges. d. Wiss. zu Göttingen. Math.-phys. Kl. 1899, S. 104.

**) Nernst nimmt also Durchlässigkeit der „halbdurchlässigen" Membrane für gewisse Ionen an. Auch bei dem jetzigen durch die Unter-

Vielleicht läßt sich hierüber mehr sagen, vielleicht läßt sich über den Reizungsvorgang eine genauere Vorstellung entwickeln; denn wir wissen jetzt, daß Ionen die vorzüglichsten Fällungsmittel für Kolloide sind. Wir können also mit Fällungen in der kolloidalen Plasmahaut als Effekt wenigstens der elektrischen Reizung rechnen*); deren unmittelbare Folge müßte eine abgeänderte Permeabilität, also abgeänderte Stoffaustauschbedingungen für das Innere der gereizten Zelle sein.

Das Studium der Elektrolyteinflüsse auf die Kolloide gewinnt vielleicht unter diesem Gesichtspunkt weiter an Interesse. Unter diesem Gesichtspunkt der „Kolloiderregbarkeit" sind auch die folgenden wenigen Versuche angestellt.

I. Das allgemeine Gesetz der elektrischen Erregung von du Bois-Reymond lautet:

„Nicht der absolute Wert der Stromdichtigkeit in jedem Augenblicke ist es, auf den der Bewegungsnerv (bzw. Muskel, kontraktiles Plasma überhaupt) mit Zuckung des zugehörigen Muskels (bzw. Erregung überhaupt) antwortet, sondern die Veränderung dieses Wertes von einem Augenblick zum andern, und zwar ist die Anregung zur Bewegung, die diesen Veränderungen folgt, um so bedeutender, je schneller sie bei gleicher Größe vor sich gingen oder je größer sie in der Zeiteinheit waren."

Eine Erklärung für dieses Verhalten der reizbaren Objekte ist bisher nicht gegeben worden. Legt man nun die Anschauung zugrunde, daß Erregung Ionenanreicherung an die kolloidale Plasmahaut mit konsekutiver Ausfällung in der Plasmahaut bedeutet, so läßt sich die zweite Hälfte des du Boisschen Gesetzes so fassen: Erregung, d. h. Ausfällung kommt um so eher zustande,

suchungen der letzten Jahre geschaffenen Standpunkt der Permeabilitätsfrage kann die Annahme nicht ohne weiteres von der Hand gewiesen werden. Die Durchlässigkeit der Plasmahäute ist wenigstens für mehrere Anionen in einigen Fällen nachgewiesen (Hamburger, Koeppe, Höber), für Kationen allerdings nicht bisher bekannt. Von elektrolytischer Leitung kann man also noch nicht mit Bestimmtheit reden. Zu Ionenansammlungen an den Plasmahäuten kommt es aber jedenfalls, da diese sich, in einer theoretisch allerdings nicht durchsichtigen Weise, wie metallische Elektroden polarisieren [s. Ostwald, Z. f. physik. Chemie **6**, 71 (1890); Springmann, Wied. Ann. **51**, 140 (1894); Moritz, Z. f. physik. Chemie **33**, 513 (1900)].

*) Aber auch bei anderen Arten der Reizung als bei der elektrischen kann es zu Ionenfällungen in der Plasmahaut kommen, so bei der chemischen Reizung durch Elektrolyte, bei der Reizung durch konzentrierte Lösungen beliebiger nicht permeierender Stoffe, durch welche den gereizten Objekten Wasser entzogen wird, so daß sich ihr Inhalt, also auch ihr Ioneninhalt konzentriert.

je schneller die Ionen an die erregbaren Objekte herantransportiert werden.

Nun ist vor einiger Zeit von Freundlich*) darauf aufmerksam gemacht worden, daß eine bestimmte kolloidale Lösung nur dann bei einer bestimmten Elektrolytkonzentration ausflockt, wenn der Elektrolytzusatz jedesmal mit der gleichen Geschwindigkeit erfolgt; je langsamer der Zusatz, um so geringer die Wirkung. Freundlich beobachtete diesen Geschwindigkeitseinfluß am kolloidalen Arsensulfid, am kolloidalen Eisenhydroxyd und am Platinsol.

Im Hinblick auf die mögliche Deutung des du Boisschen Gesetzes schien es uns lohnend, die Freundlichschen Versuche auf solche Kolloide auszudehnen, die im Organismus vorkommen.

Versuche mit Eiweiß: Zu je 5 ccm filtrierten Hühnereiweißes wurden je 5 ccm 65proz. Ammonsulfatlösung zugefügt, einmal sofort, ein zweites Mal innerhalb 24 Stunden, ein drittes Mal innerhalb 48 Stunden. Der entstehende Niederschlag war am größten nach sofortigem Zusatz, am kleinsten nach Zusatz innerhalb 48 Stunden. In allen drei Fällen wurden je 5 ccm abfiltriert, auf einmal 10 ccm Ammonsulfatlösung zugesetzt und zum Sieden erhitzt. Im ersten Filtrat waren 0,172 g Eiweiß enthalten, im zweiten 0,214 g, im dritten 0,237 g.

Andere Versuche, in denen mit Ammonsulfat oder mit Magnesiumsulfat gefällt wurde, verliefen ähnlich.

Versuche mit Gelatine: Zu 5 ccm 7,5proz. Gelatinelösung wurde bei 50° innerhalb 3 mal 24 Stunden 96proz. Natriumsulfatlösung so lange zugefügt, bis ein beim Umschütteln bleibender Niederschlag entstand; 3,2 ccm Lösung waren dafür notwendig. Dasselbe Quantum wurde zu anderen 5 ccm Gelatinelösung sofort zugesetzt. Im ersten Fall war der sich absetzende Niederschlag deutlich kleiner als im zweiten Fall.

Mehrere Versuche führten zum selben Ergebnis.

Versuche mit Lecithin: Es gelang uns bisher trotz vielfacher Versuche nicht, den Geschwindigkeitseinfluß an 0,4proz. Lösungen von Merckschem Lecithin festzustellen.

Es ist also wenigstens an Eiweiß- und Gelatinelösungen geglückt, den wichtigsten Inhalt des du Boisschen Gesetzes nachzuahmen**).

---

*) Zeitschr. f. physik. Chemie 44, 129 (1903).

**) Man könnte nun allerdings gegen den Sinn unserer Versuche einwenden, daß das du Boissche Gesetz gar nicht mehr als richtig anerkannt wird. Denn 1. ist es nicht, wie du Bois meinte, allein das rasche Entstehen (bzw. Verschwinden) des Stromes, das den Reizerfolg bedingt, da Ströme stets nur dann reizen, wenn sie eine gewisse minimale Zeit fließen, und 2. gibt es Fälle, in denen auch bei Mangel jeder Intensitätsschwankung, d. h. während der Durchleitung eines konstanten Stromes, eine dauernde Erregung stattfindet. Diese „Ausnahmen" widerlegen nicht die von uns versuchte Deutung des Erregungsvorganges. — Zur Erregung ist nach dem

II. Die Reizbarkeit der Protoplasten wird durch Narkotika herabgesetzt oder aufgehoben. Auch das Plasmahautkolloid-Lecithin läßt sich narkotisieren:

Vier Waschflaschen werden hintereinander in einer Reihe an ein Wasserstrahlgebläse angeschlossen und durch alle vier Luft gesaugt. In der ersten, vom Gebläse am weitesten entfernten Flasche befindet sich 0,4proz. wässerige Lecithinlösung, die zweite ist leer, in der dritten befindet sich Chloroform, in der vierten wieder Lecithinlösung. Nach einiger Zeit werden zu je 10 ccm der beiden Lecithinlösungen 2 ccm 0,76proz. Baryumchlorid- oder 0,55proz. Calciumnitratlösung zugefügt. In der ersten Lösung entsteht ein beträchtlicher, in der zweiten ein geringer Niederschlag.

Derselbe Unterschied ergibt sich nach Durchleitung von Ätherdampf, nach Zusatz von 0,5 bis 1,0 Proz. Chloralhydrat, von 1 Proz. Amylalkohol, oder nach Durchleitung von CO_2.

Für die Erklärung der Erscheinung verweise ich auf die neueren Untersuchungen von Spiro*). Das Maßgebende ist hier, daß die Narkotika Lösungsmittel für das Lipoid Lecithin sind (Overton); durch den Zusatz des Narkotikums wird Wasser ein besseres Lösungsmittel für Lecithin, aus dem es weniger leicht auszufällen ist, als sonst, etwa wie nach Spiro kolloidales Eisenoxyd weniger leicht durch Calciumchlorid aus wässeriger Lösung

---

Gesagten zweierlei notwendig: 1. Ionenansammlung bis zu einer gewissen Konzentration, 2. eine gewisse Geschwindigkeit der Ansammlung. Die Erregbarkeit der Protoplasten ist aber verschieden, d. h. reizbarere Objekte werden einer geringeren Ionenkonzentrierung bedürfen als weniger empfindliche. So ist es ganz begreiflich, daß niedrig organisierte, also wenig erregbare Muskulaturen, wie die Ureterenmuskeln oder der Schließmuskel von Anodonta in höchst auffälligem Gegensatz zu den Skelettmuskeln im allgemeinen durch Induktionsströme nicht erregt werden trotz deren raschen Entstehens und Verschwindens und trotz ihrer relativ großen Intensität, weil in der kurzen Zeit ihrer Dauer eine zu kleine Elektrizitätsmenge in Bewegung gesetzt wird; dagegen transportiert ein konstanter Strom selbst bei kleinerer Intensität, wenn er mindestens $^1/_4$ Sekunde dauert, die nötige Elektrizitätsmenge an die erregbaren Plasmahäute heran. Die Induktionsströme wirken nur, wenn ihre Intensität eine besonders große ist (Fick, Engelmann, Biedermann). — Daß gelegentlich (z. B. bei sensiblen Nerven, bei austrocknenden Nerven, bei ermüdeten quergestreiften Muskeln) während der ganzen Dauer des Fließens eines konstanten Stromes Erregung erfolgt, widerspricht ebenfalls nicht der gegebenen Hypothese für den primären Reizeffekt; die von dem konstanten Strom veranlaßten elektrolytischen und polarisatorischen Veränderungen können sehr wohl sekundäre Wirkungen produzieren.

*) Diese Beiträge 4, 300 (1903).

ausgefällt wird, wenn Glycerin zugesetzt ist, in dem das Eisenoxyd sich löst, als aus rein wässeriger Lösung*).

III. Passiv bewegliche freie Zellen, wie rote und weiße Blutkörperchen, bewegen sich im Potentialgefälle zur Anode**). Dies Verhalten hat kürzlich der eine von uns auf den Aufbau der Plasmahaut aus negativen Kolloiden bezogen***). Hardys bekannten Versuchen entsprechend ist demnach zu erwarten, daß Alterationen der Plasmahaut durch Elektrolyte sich auf die Wirkung der Kationen zurückführen lassen. Das ist tatsächlich der Fall. Vor einiger Zeit entdeckte Loeb, daß die befruchteten Eier von Fundulus in einer Lösung von NaCl (oder LiCl, KCl, NH_4Cl) nur dann zur Entwickelung gelangen, wenn der Lösung ein wenig Salz mit zwei- oder dreiwertigem Kation zugesetzt wird; umgekehrt wird die Lösung eines Salzes mit zweiwertigem Kation zu einem brauchbaren Entwickelungsmedium für die Fundulus-Eier, wenn ihr eines der genannten Alkalichloride zugefügt wird. Zweiwertige Kationen wirken also „antitoxisch“, wenn die Alkalichloride „toxisch“ wirken. Was ist an den letzteren das Toxische, das Kation oder das Anion? Loeb beantwortete begreiflicherweise die Frage zunächst so, daß er als toxisch, als dem zweiwertigen Kation entgegenwirkend, das Anion annahm — das Kation würde dann etwa kolloidfällend, das Anion lösend wirken, aus dem Zusammenwirken beider resultierte die physiologische Protoplasmakonsistenz —, und er sah in der größeren Schädlichkeit von Alkalisalzen mit zwei- und dreiwertigem Anion gegenüber denen mit einwertigem Anion einen Beweis für seine Ansicht, um so mehr, als er konstatieren konnte, daß zur „Entgiftung“ der Salze mit zwei- und dreiwertigem Anion größere Mengen Ca^{++} nötig sind, als zur Entgiftung von NaCl†). Später††) zeigte sich dann aber, daß die Wirkungskraft der Natriumsalze mit zwei- und dreiwertigem Anion (auf Muskeln) gar nichts mit der Wertigkeit ihres Anions zu tun hat, sondern von der Bindung

*) Beiläufig wurde beobachtet, daß auch Eiweiß wenigstens mit Chloroform- und Ätherdämpfen in der Art des Lecithins narkotisiert werden kann. Zur Erklärung können Anlagerungen der Narkotika ans Eiweiß-Molekül in Betracht kommen. [Siehe Spiro, Zeitschr. f. physiolog. Chemie **30**, 182 (1900) und diese Beiträge **4**, 318 (1903).]

) Lillies Angabe (Amer. Journ. of Physiol. **8, 273, 1903), daß die Blutkörperchen vom Frosch zum Teil auch zur Kathode wandern, können wir nicht bestätigen.

***) Pflügers Archiv **101**, 607 (1904) und **102**, 196 (1904).

†) Amer. Journ. of Physiol. **6**, 411 (1902).

††) Pflügers Archiv **91**, 248 (1902). — Decennial Publ. of the Univ. of Chicago 1902.

des Calciums abhängt. Es blieb danach gar kein anderer Schluß übrig*), als daß die einwertigen Kationen im einen Sinn (toxisch), die zwei- und dreiwertigen Kationen im entgegengesetzten (antitoxisch) wirken. Wie diese Gegenwirkungen der Kationen zu erklären seien, blieb bisher unklar.

Es existiert nun aber seit langer Zeit ein Versuch an dem anodischen Kolloid von Arsensulfid, das unserer Ansicht nach ein vollkommenes Analogon zu den von Loeb studierten Objekten darstellt. Linder und Picton zeigten**), daß, wenn das Arsensulfid mit der Mischung zweier Salze mit einwertigem Kation oder zweier Salze mit zweiwertigem Kation ausgefällt wird, die Wirkungen der Salze sich einfach addieren, daß, wenn man aber mit der Mischung eines Salzes mit einwertigem und eines Salzes mit zweiwertigem Kation fällt, nicht eine Summation der Wirkungen, sondern eine gegenseitige Hemmung der Effekt ist. Wir geben Linders und Pictons Versuchsreihe in der folgenden Tabelle der zur Fällung nötigen Mengen wieder:

NH_4Cl . .	4,90				
		HCl	4,20		
NH_4Cl . .	2,00	HCl	2,40	ber. 2,50	
		HNO_3	4,10		
HCl . . .	2,35	HNO_3	1,97	ber. 1,80	
$Ca(NO_3)_2$.	4,60				
		$BaCl_2$	4,20		
$Ca(NO_3)_2$.	2,20	$BaCl_2$	2,30	ber. 2,20	
		$SrCl_2$	4,40		
KCl . . .	0,30	$SrCl_2$	4,90	ber. 4,20	Diff. 0,70
„ . . .	0,90	„	5,50	„ 3,80	„ 1,70
„ . . .	1,20	„	5,55	„ 3,60	„ 1,95
„ . . .	1,80	„	5,90	„ 3,20	„ 2,70
„ . . .	2,70	„	5,65	„ 2,60	„ 3,05
„ . . .	3,00	„	5,30	„ 2,40	„ 2,90

Der Versuch erschien uns wichtig genug, ihn einer Nachprüfung zu unterziehen. Wir verfuhren dabei zunächst so, wie Freundlich***) bei seiner Untersuchung der Kolloidfällung, d. h. wir suchten diejenige Konzentration eines Elektrolyten auf, bei der 4 ccm seiner Lösung auf 20 ccm Arsensulfidlösung gerade so stark fällend wirken, daß beim Abfiltrieren 2 Stunden nach dem Zusatz des Elektrolyten ein klares ungefärbtes Filtrat entsteht.

*) Pflügers Archiv 93, 246 (1902).
**) Journ. Chem. Soc. 67, 63 (1895).
***) Zeitschr. f. physik. Chemie 44, 129 (1903).

Nachdem so die Fällungsgrenze für verschiedene Elektrolyte gefunden war, wurden Mischungsversuche angestellt. Wirkten die Elektrolyte einfach additiv, so war zu erwarten, daß je 2 ccm der Grenzlösungen zweier Elektrolyte denselben Effekt haben würden, wie die 4 ccm von der Grenzlösung eines Elektrolyten; hemmten die Elektrolyte einander, so mußte das Filtrat trüb oder eventuell direkt gelb aussehen. Die folgende Tabelle enthält die Resultate:

Arsensulfidlösung, durch langsames Zugießen von 1 l einer 1 proz. Lösung von arseniger Säure zu 1 l Schwefelwasserstoffwasser unter Durchleitung von Schwefelwasserstoff hergestellt; Entfernen des Schwefelwasserstoffs durch Wasserstoff.

1.	4 ccm 0,23 m $^1/_2\,K_2SO_4$	Filtrat klar
	4 ccm 0,26 m NH_4Cl	„ „
	2 ccm 0,23 m $^1/_2\,K_2SO_4$ + 2 ccm 0,26 m NH_4Cl	„ „
	2 ccm 0,115 m $^1/_2\,K_2SO_4$ + 2 ccm 0,26 m NH_4Cl	„ trüb, schwach gelb
	2 ccm 0,46 m $^1/_2\,K_2SO_4$ + 2 ccm 0,26 m NH_4Cl	„ klar
2.	4 ccm 0,0088 m $^1/_2\,SrCl_2$	Filtrat klar
	4 ccm 0,003 m $^1/_2\,Ca(NO_3)_2$	„ „
	2 ccm 0,0088 m $^1/_2\,SrCl_2$ + 2 ccm 0,003 m $^1/_2\,Ca(NO_3)_2$	„ „
	2 ccm 0,0088 m $^1/_2\,SrCl_2$ + 2,3 ccm 0,003 m $^1/_2\,Ca(NO_3)_2$	„ ein wenig trüb (?)
	2 ccm 0,0088 m $^1/_2\,SrCl_2$ + 1,7 ccm 0,003 m $^1/_2\,Ca(NO_3)_2$	„ trüb
3.	4 ccm 0,23 m KCl	Filtrat klar
	4 ccm 0,003 m $^1/_2\,Ca(NO_3)_2$	„ „
	2 ccm 0,23 m KCl + 2 ccm 0,003 m $^1/_2\,Ca(NO_3)_2$	„ trüb, gelb
	2 ccm 0,23 m KCl + 2 ccm 0,006 m $^1/_2\,Ca(NO_3)_2$	„ leicht trüb
	2 ccm aq. dest. + 2 ccm 0,006 m $^1/_2\,Ca(NO_3)_2$	„ klar
4.	4 ccm 0,23 m KCl	Filtrat klar
	4 ccm 0,0088 m $^1/_2\,SrCl_2$	„ „
	2 ccm 0,23 m KCl + 2 ccm 0,0088 m $^1/_2\,SrCl_2$	„ gelb
	2 ccm 0,23 m KCl + 2 ccm 0,0176 m $^1/_2\,SrCl_2$	„ kaum trüb
	2 ccm aq. dest. + 2 ccm 0,0176 m $^1/_2\,SrCl_2$	„ klar
5.	4 ccm 0,23 m $^1/_2\,K_2SO_4$	Filtrat klar
	4 ccm 0,0088 m $^1/_2\,SrCl_2$	„ „
	2 ccm 0,23 m $^1/_2\,K_2SO_4$ + 2 ccm 0,0088 m $^1/_2\,SrCl_2$	„ gelb
	2 ccm 0,23 m $^1/_2\,K_2SO_4$ + 2 ccm 0,0176 m $^1/_2\,SrCl_2$	„ trüb, leicht gelb.

Für das Resultat war es gleichgültig, ob die beiden Elektrolyte nacheinander oder als Mischung zugleich der Arsensulfidlösung zugefügt wurden.

Wir können also die Angaben von Linder und Picton nur bestätigen, können aber noch hinzufügen, daß, wie im physiologischen Experiment, die Wertigkeit des Anions keine Rolle zu

spielen scheint. Wirksam sind nur die Kationen, und diese sind bei verschiedener Wertigkeit Antagonisten zu einander*).

Noch einmal sei betont, daß wir es beim Arsensulfid mit einem anodischen Kolloid zu tun haben; denn erst dadurch wird es begreiflich, daß die Verhältnisse bei den Organismen mit ihren anodischen Plasmahäuten ganz analoge sind, daß hier wie dort die Kationen-Mischung in erster Linie für einen bestimmten normalen Zustand der Kolloide maßgebend ist, und daß eine Veränderung der Mischung eine Schädigung oder eine Erregbarkeitsänderung verursacht.

*) Unsere Versuche waren abgeschlossen, als uns Paulis sehr interessante Mitteilung „über irreversible Eiweißfällungen durch Elektrolyte" (diese Beiträge 5, 27) bekannt wurde, in der die Existenz des Kationen-Antagonismus an Eiereiweiß nachgewiesen wird. Siehe auch die Versuche von Koch [Zeitschr. f. physiol. Chemie 37, 181 (1903)].

XXIX.

Zur Kenntnis der Stickstoffbindung im Eiweiß.

Von **C. H. Rothera** (Cambridge).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Im Anschluß an die Untersuchung Gümbels*) habe ich eine Anzahl von Versuchen über die Stickstoffverteilung im Eiweiß ausgeführt, in der Absicht, festzustellen: 1. ob der sogenannte Amidstickstoff einheitlicher Natur sei, 2. ob sich das Melanoidin auf Kosten einer bestimmten Stickstoffform bildet, 3. ob das Hausmannsche Verfahren auf bisher nicht untersuchte Proteidstoffe mit Erfolg anwendbar sei. Dieses Programm konnte in der kurzen mir zur Verfügung stehenden Zeit nur zum Teil erledigt werden, zumal da unerwartete Befunde Anlaß gaben, mit Absicht von ihm abzuweichen.

I. Über die Einheitlichkeit des „Amidstickstoffs".

Wie Gümbel**) bereits hervorgehoben hat, beobachtete G. Embden in bisher nicht veröffentlichten Versuchen, daß die beim Zerkochen von Eiweiß mit Salzsäure erhaltene Zersetzungsflüssigkeit beim Destillieren mit Magnesia im Vakuum unter 40 bis 42° weniger Ammoniak ergibt als beim Kochen unter gewöhnlichem Druck. Gümbel legte auf diesen Befund kein besonderes Gewicht, empfahl aber immerhin, künftig die Bestimmung des Amidstickstoffs durch Vakuumdestillation vorzunehmen. Die sofort mitzuteilenden Erfahrungen lassen es zweckmäßiger erscheinen, die Amidbestimmung sowohl mit Hilfe des Vakuums bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur wie auch bei Atmosphärendruck auszuführen, weil, wenigstens bei bestimmten Eiweißkörpern, beide Modifikationen des Verfahrens scharfe und charakteristische aber nicht identische Werte liefern.

Ich habe meine Versuche mit nach Hopkins dargestelltem reinem Serumalbumin aus Pferdeblut ausgeführt.

---

*) Diese Beiträge 5, 297.

**) Ebenda S. 301.

Das Serumalbumin war zweimal umkristallisiert, rein kristallinisch: es wurde durch Dialyse gegen fließendes Wasser von dem größten Teil des anhaftenden Salzes befreit, dann nach Koagulation mit Alkohol durch Extraktion mit Wasser, Alkohol und Äther gereinigt, schließlich bei 105° getrocknet. Die untersuchten Präparate enthielten fast genau 15,0 Proz. Stickstoff.

Zu dem einzelnen hydrolytischen Versuch benutzte ich je 0,6 bis 1,0 g trockene Substanz. Das Zerkochen mit Säure dauerte 6 bis 7 Stunden; dann wurde die Säure erst mit stickstofffreier Natronlauge zum größten Teil abgestumpft, sodann die Lösung mit ausgeglühter Magnesia übersättigt.

Die Destillation der magnesiahaltigen Flüssigkeit im Vakuum ergab nun bei einer Wärme des Außenwassers von 40 bis 60° in den einzelnen Versuchen auffallend verschiedene Werte, die sich ungezwungen in zwei Reihen bringen ließen. In der einen Reihe (A) erreichte die Menge des austreibbaren Ammoniaks die von Hausmann und Gümbel angegebenen Werte, in einer anderen Reihe von Versuchen (B) blieb sie um einen konstanten Betrag dahinter zurück.

Tabelle 1.

Vers. Nr.	Angewandte Säure	Amidstickstoff in Proz. der Substanz	Mittel
		Reihe A.	
1	Chlorwasserstoff	0,92	
2	„	0,99	
3	Jodwasserstoff	1,00	0,98
4	„	1,04	
5	„	0,97	
6	„	0,95	
		Reihe B.	
7	Chlorwasserstoff	0,66	
8	„	0,69	
9	Jodwasserstoff	0,71	0,68
10	Chlorwasserstoff und Zinnchlorür	0,68	

Die Ursache der beobachteten Differenz lag anscheinend in der ungleichen Temperatur der destillierenden Flüssigkeit. Die höheren Zahlen wurden nämlich namentlich dann erhalten, wenn infolge weitgehender Destillation die Kochsalz und Chlormagnesium haltende Flüssigkeit eine höhere Konzentration erreichte und demgemäß einen höheren Siedepunkt besitzen mußte. Eigene Versuche zur Begründung dieser Ansicht anzuführen, war nicht notwendig, da, wie ich in Erfahrung brachte, Herr Dr. Embden in bereits vor längerer Zeit ausgeführten Versuchen die gleiche Erscheinung

am kristallisierten Serumalbumin beobachtet und auch im obigen Sinne aufgeklärt hat.

Bei den betreffenden Versuchen, die mir Herr Dr. Embden gütigst mitzuteilen gestattet, ermittelte er an kristallisiertem Serumalbumin den „Amidstickstoff" durch Destillation einmal im Vakuum bei 40 bis 42°, sodann im Rückstand bei gewöhnlichem Druck, also bei 100°. Jede einzelne Destillation dauerte zum mindesten 4 Stunden*).

Vers. Nr.	1. Destillation Amid-N (40 bis 42°) Proz.	2. Destillation**) Rest des Amid-N (100°) Proz.
I	0,665	—
II	0,668	0,51
III	0,671	0,50
IV	0,676	0,50

Embdens und meine Versuche lehren, daß bei der Säurespaltung nur etwa zwei Drittel des dem Serumalbumin zukommenden Amidstickstoffs direkt in Form von Ammoniak erhalten werden und sich daher bei 40° im Vakuum überdestillieren lassen. Das letzte Drittel muß zunächst in einer anderen Form vorhanden sein und wird erst durch Kochen mit Magnesia bei einer merklich höheren Temperatur in Ammoniak übergeführt.

Bei der Schärfe, mit der die Bestimmung beider Arten von Amidstickstoff ausführbar ist, dürfte in manchen Fällen die gesonderte Ermittelung beider Amidwerte für die Charakterisierung und Konstitutionsbestimmung der Proteide von Interesse sein.

II. Über Eiweißspaltung unter Reduktion.

Ob die bei Säurespaltung von Eiweiß meist auftretenden dunkelgefärbten Stoffe (Melanine, Huminkörper) auf Kosten des Amidstickstoffs oder des in einer anderen Art gebundenen Stickstoffs entstehen, ist nicht entschieden. Wie bereits Hausmann***)

*) Nach meinen Erfahrungen geht bei Destillation im Vakuum das vorhandene Ammoniak in 2 bis 2½ Stunden restlos über.

**) Die zweite Destillation wurde hier aus nicht zu erörternden Gründen unter Zusatz von Bleiacetat vorgenommen. Die erhaltenen Zahlen sind daher nicht ohne weiteres mit den sonst ohne solchen Zusatz erhaltenen vergleichbar. Doch steht die Summe der beiden Amidwerte 0,67 + 0,50 = 1,17 der von Hausmann, Gümbel und mir ermittelten Zahl für den gesamten Amidstickstoff (1,01 bis 1,04 Proz.) nahe. Bei der sich anschließenden vielständigen dritten Destillation wurden nur sehr geringe Mengen Ammoniak, unter 0,1 Proz. erhalten.

***) Zeitschr. f. physiol. Chemie 27, 100.

bemerkt, kann Aufklärung über diesen Punkt von Versuchen erwartet werden, bei denen die Melaninbildung von vorneherein vermieden wird.

Wie schon vor drei Dezennien Hlasiwetz und Habermann*) gezeigt haben, kann man durch Zusatz von Zinnchlorür die Dunkelfärbung der bei Salzsäurespaltung resultierenden Flüssigkeit in hohem Maß einschränken. Ich habe daher Zersetzungsversuche mit verschiedenen Säuren unter gleichzeitiger Reduktion ausgeführt. Es kamen zur Verwendung

a) rauchende Salzsäure (20 ccm auf 1 g Eiweiß),
b) 40 Proz. Schwefelsäure (20 ccm),
c) Jodwasserstoff von 1,7 D. (20 ccm),
d) Salzsäure mit Zinnchlorür (30 ccm rauchende Salzsäure, 5 bis 6 g Zinnchlorür),
e) Salzsäure (30 ccm) mit metallischem Zinn,
f) Schwefelsäure mit metallischem Zinn.

Bei Ausführung der Bestimmung hielt ich mich, wie auch sonst, an Gümbels Angaben.

Bemerkt sei, daß nach Abdestillieren des im Vakuum austreibbaren Stickstoffs der Rückstand von der ungelöst gebliebenen Magnesia und dem Melanin abfiltriert wurde. Die Stickstoffbestimmung an dem gut ausgewaschenen Magnesianiederschlag ergab den „Melaninstickstoff". Filtrat und Waschwasser wurden dann unter lebhaftem Sieden auf etwa 150 ccm eingeengt, wobei die schwerer abspaltbare Fraktion des Amidstickstoffs völlig weggetrieben wurde.

Zu der eingeengten Flüssigkeit wurden 10 bis 20 ccm konzentrierter Salzsäure und 10 ccm gesättigter Lösung von Phosphorwolframsäure zugefügt, der kristallinische Niederschlag in der Regel nach 24stündigem (oder, wie in der Tabelle speziell angegeben, nach 44stündigem) Stehen mit der Saugpumpe scharf abgesaugt und mit verdünnter Lösung von Phosphorwolframsäure (1 Vol. gesättigte Lösung, 1 Vol. 10proz. Salzsäure, 18 Vol. Wasser) gewaschen. Das 180 bis 200 ccm betragende Gesamtfiltrat wurde abgemessen, 20 ccm davon dienten zur Stickstoffbestimmung. Der Niederschlag wurde mit Natriumkarbonat gelöst, das Volum auf 80 oder 100 ccm gebracht, der Stickstoffgehalt in 20 ccm ermittelt.

Die Kjeldahlbestimmungen geschahen unter Zusatz von Kupfersulfat. Reagenzien und Wasser waren stickstofffrei, bzw. es wurde der Gehalt an Ammoniak in speziellen Versuchen bestimmt und in Abzug gebracht. Die mitgeteilten Zahlen sind das Mittel gut stimmender doppel- oder dreifacher Analysen.

Bei Zusatz von Zinn oder Zinnchlorür wurde dieses vor der weiteren Prozedur mit Schwefelwasserstoff entfernt, das Filtrat im Vakuum von Schwefelwasserstoff befreit.

Nachstehend gebe ich die erhaltenen Zahlen in tabellarischer Zusammenstellung.

*) Annalen d. Chemie und Pharm. **169**, 150.

Tabelle II.

	Nr. des Vers.	Verwendet	Melanoidin-stickstoff	Monamino-stickstoff	Diamino-stickstoff	Monamino-N / Diamino-N	Bemerkungen
a)	8	HCl	nicht best.	8,95	4,68	1,91	Ndschl. stand 44 Stunden
	11	"	" "	9,37	4,94	1,90	
	12	"	0,25	9,89	5,09	1,94	
b)	13	H_2SO_4	0,196	8,87	5,06	1,75	
c)	6	HJ	—	10,14	4,29	2,36	
	5	"	—	10,13	4,22	2,40	Ndschl. stand 44 Stunden
	14	"	—	10,09	3,83	2,64	
d)	10	$HCl + SnCl_2$	—	9,99	—	—	
	15	"	—	9,98	4,25	2,35	Ndschl. stand 44 Stunden
	16	"	—	10,00	4,02	2,48	
e)	17	HCl + Sn	—	9,7	4,07	2,38	
f)	18	H_2SO_4 + Sn	—	*)	*)	2,47	

Während die Menge des Amidstickstoffs, wie aus Tabelle I (s. oben) hervorgeht, bei reduktiver Eiweißspaltung keine Änderung erfährt, zeigt die obige Tabelle regelmäßig eine durch die Reduktion bewirkte Zunahme der Monamino- und ebenso regelmäßig eine Abnahme der Diaminowerte. Das Verhältnis des Monaminostickstoffs zum Diaminostickstoff berechnet sich zu 2,35 bis 2,64, im Mittel zu 2,44, während es sich für einfache Salzsäurespaltung bei mir zu 1,92, bei Gümbel zu 1,80, für einfache Schwefelsäurespaltung zu 1,75 ergibt.

Die Säurespaltung liefert sonach bei gleichzeitiger Reduktion die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stoffe in geringerer Menge. Es wird von Interesse sein, durch spezielle Untersuchung klarzustellen, welche Spaltungsprodukte des Eiweißes an dieser Abweichung der Stickstoffverteilung beteiligt sind. Dann wird sich auch sagen lassen, ob die höheren oder niedrigeren Diaminozahlen als für die Beurteilung des Eiweißaufbaus verwertbar anzusehen sind.

Der Umstand, daß trotz fehlender Melaninbildung die gleichen Werte für den Amidstickstoff erhalten wurden, wie sonst, zeigt, daß die Bildung der Melanine, wenigstens der Hauptmasse nach, nicht auf Kosten des leicht abspaltbaren Stickstoffs erfolgt.

III. Die Stickstoffverteilung im Ichthyn von Torpedo marmorata und Acipenser Sturio.

Die von mir am kristallisierten Serumalbumin bei einfacher Salzsäurespaltung erhaltenen Stickstoffwerte stimmen, wenn man

*) Ein Teil der Flüssigkeit ging verloren, so daß bloß das relative Verhältnis von Monamino- und Diamino-Stickstoff ermittelt werden konnte.

sie, wie das Gümbel getan hat, auf den von Gürber und Michel ermittelten Stickstoffgehalt des Serumalbumins von 15,93 Proz. umrechnet, gut mit den von Hausmann und Gümbel gefundenen überein:

	Amid-N Proz.	Melanin-N Proz.	Monamino-N Proz.	Diamino-N Proz.
Hausmann	1,01	—	—	—
Gümbel	1,01	0,18	9,61	5,30
Eigene Versuche	1,04*)	0,26	9,98	5,21

Wie man sieht, ist auch die Übereinstimmung der Werte für Diaminostickstoff befriedigend.

Ich habe noch für einen weiteren kristallisierten Eiweißkörper, das Ichthyn der Eier von Torpedo marmorata, die Stickstoffverteilung ermittelt und zum Vergleich ein Präparat von Störichthyn der hiesigen Institutssammlung herangezogen.

Das Torpedoichthyn stellte ich mir aus Eiern von Torpedo marmorata dar, die mir von Herrn Dr. v. Fürth gütigst überlassen worden waren. Diese Eier enthalten reichlich rektanguläre Eiweißkristalle, die beim Aufbewahren ihre Löslichkeit in Wasser und Neutralsalzlösungen einbüßen. Auch im vorliegenden Falle waren sie nicht mehr in Lösung zu bringen, sie ließen sich aber mittels Kolieren durch grobes Leinen, Schlämmen und Zentrifugieren so vollständig von geformten Beimengungen trennen, daß sie schließlich ein rein weißes, feines, unter dem Mikroskop ausschließlich aus Kristallen bestehendes Pulver darstellten. Durch Waschen mit Wasser, Alkohol und Äther wurden sie von anhaftenden chemischen Beimengungen, namentlich einem gelblichen Öl befreit. Sie enthielten wenig Asche, darin viel Phosphor neben etwas Eisen.

Die reine Substanz bot die gewöhnlichen Eiweißreaktionen einschließlich der Proben von Molisch, Millon und Hopkins. Bei einstündigem Kochen mit verdünnter Salzsäure lieferte sie eine stark reduzierende Lösung, in der sich Purinbasen nicht nachweisen ließen. Es liegt hier somit anscheinend — wie bei Walters Ichthulin — ein Phospho-Glykoproteid vor.

Die Untersuchung der Stickstoffverteilung ergab:

Substanz	Gesamt-N	Amid-N	Melanin-N	Monamino-N	Diamino-N	Monamino-N / Diamino-N
Torpedoichthyn	15,67	1,33	0,198	9,43	3,93	2,40
	15,72	1,30	—	9,73	4,05	2,40
Störichthyn	16,09	1,54	0,158	10,23	4,44	2,30
		1,51	0,111	10,21	4,45	2,29
		1,52	0,200	—	—	—

*) Davon 0,72 in Ammoniakform.

Die Unterschiede in den für beide Ichthyne erhaltenen Werten sind so groß und so konstant, daß zunächst angenommen werden muß, daß es sich um zwei verschiedene Eiweißkörper handelt. Ein sicherer Schluß wird durch den Umstand unmöglich gemacht, daß über die Darstellung des von Hoppe-Seyler herrührenden Störichthynpräparates nichts näheres festgestellt werden konnte.

Anhangsweise teile ich das Ergebnis eines Versuchs mit, in dem ich die Stickstoffverteilung im Chitin zu ermitteln suchte.

Gesamt-N	Amid-N	Melanin-N	Monamino-N	Diamino-N
6,97	2,186	0,265	3,94	0,08
	2,8	0,163	—	—

Dieses Ergebnis ist nicht ohne weiteres mit der Vorstellung in Einklang zu bringen, daß das Chitin nur ein acetyliertes Glykosamin darstellt. Zwar könnte die geringe Menge von Diaminostickstoff auf Beimengungen bezogen werden, allein die auffallend große Menge von Amidstickstoff stimmt schlecht zu der sonst beobachteten Säurebeständigkeit des Glykosamins.

Immerhin ergab sich, daß die Abspaltung des Amidstickstoffs in diesem Falle wenigstens zum Teil ein sekundärer Vorgang ist. Bei 4½ stündigem Kochen von Chitin mit Salzsäure und Zinnchlorür wurde bloß 1,14, bei 7stündigem Kochen 2,12 Proz. Amidstickstoff erhalten.

Ich habe nicht Gelegenheit gehabt, den Gegenstand, der vielleicht für die Beurteilung der bei glykosaminreichen Eiweißkörpern erhaltenen Stickstoffzahlen von Belang ist, weiter zu verfolgen.

XXX.

Über die Aufnahme von Wasser und Salz durch die Epidermis und über die Hygroskopizität einiger Keratingebilde.

Von **Wilh. Filehne** und Dr. **Biberfeld**.

Aus dem pharmakologischen Institute der Universität Breslau.

In einer früheren Arbeit*) hatte der eine von uns mitgeteilt, daß Kochsalz sich in Lanolin nicht löse und daß auch mit wässeriger Kochsalzlösung versetztes Lanolin ein erwärmtes, mit Lanolin imprägniertes Filter durchsetze, ohne Kochsalz mitzuführen. Wie wir alsbald sehen werden, gilt diese letztere Angabe nur für die seinerzeit in unserem Institute geübte Behandlung, nämlich wenn das mit Kochsalzlösung gut durchknetete Lanolin einige Zeit in flüssigem, erwärmtem Zustande gehalten wird, bevor man es filtriert. Damals wurde geschlossen: wenn Lanolin bei Zusatz von Salzlösung Wasser chemisch binde oder löse, so binde es nicht die wässerige Salzlösung, sondern nur Wasser. Im Grunde genommen lag nun, wenn schon das Wasserbindungsvermögen im pharmazeutischen Sinne beim Lanolin so ganz besonders ausgesprochen ist, für die Unterstellung, daß das Lanolin chemisch wirklich Wasser binde, ein ausreichender Anlaß damals nicht vor. Scheidet sich doch Lanolinum hydricum bei geeignetem, langsamem Erwärmen in zwei Schichten: die obere Schicht ist mehr oder weniger wasserfreies Lanolin, die untere ist Wasser; dies spricht denn doch einigermaßen gegen „chemische“ Bindung.

Wir bemühten uns nun das etwaige chemische Bindungsvermögen des Lanolins für Wasser durch direkte Versuche festzustellen.

Wir verrieben wässerige Kochsalzlösungen verschiedener Konzentration in passenden Quantitäten mit Lanolin. Da Kochsalz vom Lanolin nicht aufgenommen wird (s. auch weiter unten), so müßte sich während des Reibens in dem Reste der zugesetzten Flüssigkeit die Konzentration um

---

*) Berl. klin. Wochenschrift 1898, Nr. 3.

so mehr erhöhen, je mehr Wasser aus ihr ins Lanolin übergeht. Die wiederholt vorgenommenen Titrierungen ergaben keine Änderung des Chlornatriumgehaltes in der noch „ungebundenen" Flüssigkeit.

In der Hauptsache verschwindet also das Wasser zugleich mit dem Kochsalz. Selbstverständlich könnte ein minimaler, also durch Titrierung nicht nachweisbarer Teil des Wassers ohne Kochsalz sich im Lanolin doch noch echt lösen oder binden.

Wo aber kommt die Hauptmenge, d. h. die Salzlösung unter? Je mehr wässerige Kochsalzlösung dem Lanolin zugesetzt, und je gründlicher sie verrieben wird, um so mehr wird das Gemisch weißlich, undurchsichtig. Unter dem Mikroskope sieht man — ebenso wie beim „Lanolinum hydricum" — in der homogenen „Grundsubstanz" (Lanolin) neben spärlichen Luftbläschen allerfeinste Tröpfchen von Kugelgestalt, die, wie uns schien, nach Zugabe von Silbersalpeterlösung zum feinausgestrichenen Präparate zum Teil wesentlich deutlicher hervortreten (im durchfallenden Lichte). Im Lanolinum anhydricum dagegen sieht man in der „Grundsubstanz" außer spärlichen Luftbläschen und sonstigen Verunreinigungen nichts von jenen feinen Kügelchen. Die Lanolinkochsalzlösungsmischung haben wir also durch gründliches Verreiben in eine Emulsion umgewandelt. — aber wohlverstanden nicht in eine Emulsion von Lanolin in wässerigem Menstruum, sondern umgekehrt in eine Emulsion von wässeriger Salzlösung innerhalb des Vehikels Lanolin. Dementsprechend war zu erwarten. daß diese Emulsion einschließlich der in ihr enthaltenen, d. h. emulgierten wässerigen Lösung durch ein mit Lanolin getränktes (erwärmtes) Filter gehen würde, — ebenso wie eine Ölemulsion, d. h. eine Emulsion, in der Öl innerhalb des Vehikels Wasser (oder Kochsalzlösung) emulgiert ist, mitsamt dem Öl durch ein mit Wasser angefeuchtetes Filter geht. Der Versuch bestätigte diese Erwartung. Das Lanolinfiltrat mit Äther aufgenommen gibt beim Schütteln mit Wasser an dieses Kochsalz ab [Niederschlag mit Silbernitrat]*).

Es bedarf wohl kaum einer besonderen Darlegung, daß diese Art von Kochsalzdurchgang durch ein lanolingetränktes Filter nicht im Widerspruche steht mit unseren früheren Beobachtungen über die Unlöslichkeit des Chlornatriums in Lanolin. Noch weniger kann diese unsere jetzige Beobachtung im Sinne der Permeabilität der Epidermis — als einer mit Cholesterinfett getränkten Diffusionsmembran — für wässerige Lösungen von Kochsalz und anderen wasserlöslichen, aber in Lanolin unlöslichen Salzen verwertet werden.

Wir haben nun noch die Umkehrung unseres soeben beschriebenen Versuches gemacht, wir stellten — in der Wärme — eine Emulsion von Lanolin in Wasser (mittels arabischen Gummis) her und gossen diese — warm — auf ein mit heißem Wasser angefeuchtetes Filter. Solange die Flüssigkeit warm genug ist, geht emulgiertes Lanolin wie emulgiertes Öl mit der wässerigen Grundflüssigkeit durch das wassernasse Filter.

Sonach haben wir gefunden, daß die pharmazeutische „Bindung" von Wasser und Salzlösung durch das Lanolin eine Emulgierung ersterer in letzterem ist; dagegen haben wir für eine chemische

*) Der Versuch gelingt in der angegebenen Weise nur dann, wenn die Emulsion ohne weiteres auf das Filter gebracht wird. Bei einigem Stehen in der Wärme bilden sich die oben besprochenen zwei Schichten.

Bindung oder Lösung von Wasser und wässeriger Salzlösung in Lanolin auf diesem Wege keinerlei Beweise erlangt.

In der zitierten früheren Arbeit hatte der eine von uns angegeben, daß größere Lanolinmengen (erstarrt oder geschmolzen) in Berührung mit bestimmten Wassermengen das Volumen des Wassers nicht vermindern, — daß also durch die bloße Berührung des Lanolins mit Wasser kein Lanolinum hydricum entstehe. Wir wissen jetzt, daß, um Lanolinum hydricum zu bilden, ein emulgierender Faktor hinzutreten muß. Es wäre aber unrichtig, aus jenen früheren Versuchen schließen zu wollen, daß das Lanolin auch nicht die minimalsten Mengen Wasser zu lösen vermöge. Für biologische, für praktische Verhältnisse mag dieses Lösungsvermögen außer acht zu lassen sein, von einer absoluten Unlöslichkeit kann aber nach allem, was die physikalische Chemie lehrt, nicht die Rede sein. Immerhin war es uns von Wert, einiges über die quantitativen Verhältnisse dieses Lösungsvermögens zu erfahren und zwar einerseits an und für sich, andrerseits im Zusammenhang mit der Frage nach der Hygroskopizität der Oberhaut und des sie zusammensetzenden Materiales.

In einem kleinen Becherglase (von etwa 80 ccm Inhalt) befanden sich etwa 20 ccm destilliertes Wasser; diese waren in der Wärme mit einer zur vollständigen Bedeckung eben ausreichenden Lanolinschicht übergossen worden; beim Erkalten ergibt dies in der Mitte, in der Achse, eine Dicke der Deckschicht von etwa einem Millimeter, an der Wand des Glases von etwa $2^1/_2$ bis 3 mm. Sofort nach dem Erkalten auf Zimmertemperatur wird das Bechergläschen auf der analytischen Wage gewogen und alsbald in einen Thermostaten von 48° C gebracht, woselbst es 7 Tage und darüber belassen wird. Vom 2. oder 3. Tage an*) wird es etwa alle 2 Tage zeitweilig herausgenommen und, nachdem es eben Zimmertemperatur angenommen hatte, sofort gewogen und alsbald wieder in den Thermostaten gebracht. Es zeigte sich, daß es bei diesen Temperaturverhältnissen usw. pro Tag und Quadratcentimeter der Oberfläche etwa $^1/_2$ mg an Gewicht verliert.

Eine Fehlerquelle, die gerade hier nicht nennenswert in Betracht kommt, dagegen bei unseren später zu besprechenden Diffusionsversuchen recht unbequem geworden ist, sei hier erwähnt: die Bildung von Spalten im erstarrenden Lanolin (zumal an der Glaswand), die offenbar zur Luft- und Flüssigkeitsverbindung zwischen der abgesperrten wässerigen Flüssigkeit (hier destilliertes Wasser) und dem Raum oberhalb der erstarrten Lanolinschicht führten. In den Versuchen über Wasserverdunstung ist die Gefahr eines Irrtums dadurch zu vermeiden, daß das Bechergläschen während des Abkühlens gut bedeckt wird, und daß sofort nach dem Erkalten die Wägung erledigt und das Glas in den Wärmeschrank zurückgebracht wird; hier, wo das erwärmte Lanolin das Wasser als Flüssigkeitsschicht bedeckt, kann das Wasser nur „durch das Lanolin hindurch"

*) Wenn die Lanolinschicht 1 cm hoch ist, haben wir noch nach 14 Tagen keinen Gewichtsverlust gesehen.

verdunsten, d. h. es muß sich im Lanolin erst lösen und dann an der freien Oberfläche aus der Lösung abdunsten.

Es wanderte also bei besonders günstigen Lösungs- und Verdunstungsverhältnissen (etwa 50° C) in unseren Versuchen, etwa vom 2. Tage an beobachtet, $^1/_2$ mg pro qcm und Tag durch das Lanolin; die entsprechende Wassermenge war also im Lanolin gelöst gewesen.

Wollte man dies auf die Verhältnisse der menschlichen Haut im Bade übertragen, so wäre zunächst folgendes zu bedenken. Wir machen die kaum zulässige Voraussetzung, daß der Durchtritt des Wassers sofort beginne, wir erlauben ferner die Annahme, daß die feuchten Gewebe und die Säfte des etwa durstig gedachten Menschen ebenso gierig das Wasser fortnehmen wie die trockene Luft unseres Thermostaten, wir erlauben sogar den mächtigen Temperaturunterschied zwischen den Objekten unserer Versuche (etwa 50°) und der gewöhnlichen Badtemperatur zu vernachlässigen, — dann bedeutete bei einer Baddauer von $^1/_2$ Stunde und einer badenden Körperoberfläche von etwa $^1/_2$ qm unser Befund im Maximum eine Aufnahme von Wasser im Betrage von 0,05 g! In Wirklichkeit könnte nach dem soeben ausgeführten nur wesentlich weniger, d. h. also eine gänzlich zu vernachlässigende Menge in das Cholesterinfett eindringen. Wieviel Wasser von dem übrigen Materiale der Epidermis aufgenommen wird, ist eine Frage, die wir später behandeln werden.

In ähnlicher Weise können wir ausrechnen, wie groß der Anteil des Cholesterinfettes der Epidermis an der Wasserabgabe der Gesamthaut an die Luft ist, die wir mit den Handbüchern der Physiologie auf etwa 600 g in 24 Stunden bei behaglicher Temperatur (in der Ruhe) bewerten. Da jetzt die Oberfläche des Kopfes usw. mit in Rechnung zu kommen hat, so nehmen wir als Oberfläche etwa 6000 qcm, die in 24 Stunden gemäß unseren Versuchen 3000 mg = 3,0 g Wasser liefern könnten. Da aber unsere Haut nicht 48° C heiß ist wie unsere Versuchsobjekte, und da die uns umgebende Luft ebenfalls für gewöhnlich wesentlich weniger warm ist und feuchter als unsere trockene Thermostatenluft von 48°, so dürfte in Wirklichkeit nur ein geringer Bruchteil der berechneten 3 g, also wesentlich weniger als $^1/_2$ Prozent der tatsächlichen Leistung der Haut durch das Cholesterinfett besorgt werden; also auch hier kommt für biologische Fragen das Lösungsvermögen des Lanolins für Wasser nicht in Betracht.

Eine gewisse Löslichkeit des Wassers in Lanolin ist also immerhin -- wie sich von selbst verstand — vorhanden. Es fragt sich nun noch, wie weit sich diese in einer etwaigen Hygros-

kopizität des Lanolins zu erkennen gebe. Die Hygroskopizität überhaupt beruht bei den hygroskopischen Elementargebilden in einigem Gegensatze zu den hygroskopischen Materialien (reine Schwefelsäure, Chlorcalcium) offenbar auf zwei Einflüssen. Während bei letzteren die „chemische Affinität" im wesentlichen das allein in Betracht kommende ist, haben wir bei ersteren — beispielsweise bei dem Haar oder der Epidermis — einerseits die „Adsorption", andrerseits das „Quellungsvermögen", d. h. Lösungsvermögen für Wasser als das wesentliche zu bezeichnen. Freilich ist letzteres im Grunde ja wohl auch eine „chemische Affinität" in irgend einem Sinne. Die Adsorption ist die Verdichtung des Wasserdampfes auf der Oberfläche und bei porösen von mehr oder weniger kapillären Räumen durchzogenen Körpern nicht bloß auf der äußeren, sondern auch auf den inneren Oberflächen. Von hier aus findet das „Eindringen" des Wassers in die Substanz selbst, d. h. die „Lösung" des Wassers in dem Stoffe — hier dem Keratin — statt.

In bezug auf das Cholesterinfett, das die Keratingebilde erfüllt, war also festzustellen, wie es sich in Luft verhält, die mit Feuchtigkeit gesättigt ist.

Zwei Schemata wurden für diese Versuche innegehalten:

1. In eine „feuchte Kammer" (Glasglocke mit feuchtem Fließpapier und Wasserschälchen) wurde Lanolin. anhydric. gebracht, das auf einem Uhrschälchen dünn ausgestrichen war und dort bei Zimmertemperatur 3 bis 5 Wochen belassen, vorher und nachher auf der analytischen Wage gewogen wurde.

2. Lamettafäden werden in flüssiges (erwärmtes) Lanolin getaucht; man läßt das überflüssige Lanolin abtropfen; die Fäden werden gewogen, in eine „feuchte Kammer" gebracht (Zimmertemperatur) und nach 3 Tagen wieder gewogen. Zur Kontrolle wird eine ähnliche Portion unbehandelter Lamettafäden gewogen und ebenso lange in die feuchte Kammer gebracht. Bei beiden Versuchsreihen ist keine, auch nicht die geringste Gewichtszunahme am Lanolin zu konstatieren.

Sonach ist Lanolin in keiner Weise hygroskopisch. Es zeigt keine Adsorption, keine Kondensation von Wasser, denn es nimmt in Wasserdampf gesättigter Luft an Gewicht nicht zu. Auch die „Quellung" des Lanolins, die „Lösung" von Wasser im Lanolin ist unter den genannten Bedingungen praktisch gleich Null, d. h. nicht nachweisbar.

Um das Lösungsvermögen des Lanolins für Wasser erkennbar zu machen, bedarf es eben jenes in unseren oben beschriebenen Verdunstungsversuchen benutzten Hilfsmittels, successiv passierende Mengen zu summieren. Für uns lag es nun nahe, diesen selben Kunstgriff anzuwenden, um die Frage zu entscheiden, ob mit jenen

das Lanolin passierenden geringfügigen Wassermengen auch Kochsalz, wenn auch in noch so winzigen Mengen durchdringen könne.

Da auch hier möglichst günstige Lösungsverhältnisse erstrebt werden mußten, so wurde auch in diesen Versuchen das Lanolin dauernd flüssig erhalten — also bei 48° C, und auch sonst der Versuch in analoger Weise wie die beschriebenen Verdunstungsversuche angestellt, nur mit dem Unterschiede, daß statt dest. Wassers 10proz. Kochsalzlösung benutzt wurde. Das Resultat war: selbst nach 3 Wochen enthielt die nach dem Erkalten abgekratzte Lanolinschicht weder auf ihrer Oberfläche noch in ihrem Inneren auch nur Spuren von Kochsalz.

Wohl löst also Lanolin das Wasser in geringfügigen Mengen. wie wir sahen, nicht aber sind aus einer 10proz. NaCl-Lösung in 3 Wochen auch nur erkennbare Spuren von Kochsalz passiert.

Wir haben diese Frage ferner mittels eines Dialysierversuches in Angriff genommen:

Eine mit Lanolin getränkte Pergamentpapiermembran hatte hinter sich eine Lanolinschicht von etwa 15 mm Dicke; auf diese folgte dann eine 10proz. NaCl-lösung, während auf der anderen Seite der Membran destilliertes Wasser angelagert war. Die ganze Vorrichtung wurde 4 Wochen hindurch bei 32 bis 33° gehalten: es ging keine erkennbare Kochsalzspur aus der Lösung durch die Lanolinschicht und die Membran zum dest. Wasser.

Ein gleiches Ergebnis hatten in anderer Weise angeordnete Dialysierversuche, bei denen das Versuchsmaterial bei 48° C gehalten worden war.

Demnach sind Cholesterinfette (Lanolin) im praktisch biologischen Sinne als völlig undurchgängig für Kochsalzlösungen anzusehen. —

Somit war das Verhalten des Lanolins an sich dem Wasser und Salzlösungen gegenüber aufgeklärt. Es fragte sich nun, wie sich Gebilde, die im wesentlichen aus demselben Materiale wie die menschliche Epidermis bestehen, also fettimprägnierte Keratingebilde in bezug auf Wasser und Salzlösungen verhalten.

Wir benutzten als Repräsentanten der Keratingebilde Schafwolle, Menschenhaare (Frauenhaare) und Spulen von Gänsefedern, da aus bekannten Gründen Haut-Material vom Menschen unbrauchbar ist. Auch der Heranziehung von ungeformtem Keratin selbst, etwa nach der Vorschrift der vorletzten Ausgabe des Arzneibuches f. d. D. R. aus Federspulen hergestellt, glaubten wir die gereinigten Federspulen vorziehen zu sollen.

Die benutzten Materialien: zu Fäden verarbeitete „ungefärbte" Wolle. von uns auf ihre Echtheit mikroskopisch geprüft, desgleichen die Frauenhaare und die Federspulen wurden gründlich gereinigt, mit Alkohol und Äther ausgezogen (die Spulen während 8 Tagen), dann getrocknet, und zwar zunächst im Wärmeschrank, dann im Exsikkator (unter Erneuerung der wasserfreien Schwefelsäure, bzw. des Chlorcalciums des Exsikkators) bis zur Gewichtskonstanz.

Wie bekannt sind Keratingebilde hygroskopisch, und zur Herstellung eines Hygrometers wird ja auch entfettetes Frauenhaar

benutzt. Wir wollten nun wissen, wieviel Wasser ohne Rücksicht auf die Geschwindigkeit der Aufnahme vollkommen wassertrockene Wollhaare und ebensolche Federspulen aus einer mit Wasserdampf gesättigten Luft in sich aufnehmen können, wenn sie einesteils, so wie sie sind, andernteils vollständig mit flüssigem (48° C) Lanolin und drittens mit Olivenöl getränkt zum Versuche herangezogen werden.

Die Wollfäden wurden etwa 18 Stunden im flüssigen Lanolin. bzw. im ebenso (48° C) warmen Olivenöl, die Federspulen dagegen 8 Tage in den gleichen Imprägnierungsstoffen belassen. Dieser längere Zeitraum wurde deswegen gewählt, weil er nach Angabe des Arzneibuches f. d. D. R., III. Ausgabe, erforderlich ist, um in den geeigneten Flüssigkeiten die Federkiele von Fetten, Eiweiß usw. zu reinigen. — Nebenbei sei bemerkt, daß die Wollfäden in unseren Versuchen das 2 bis 3fache ihres Eigengewichtes an Lanolin, die Federspulen aber nur einige Prozent aufnahmen. — Die Reinigung der Spulen von dem überschüssigen Lanolin erfolgte in der Weise, daß die (vor Einbringung in die Imprägnierungsflüssigkeit zugeschnittenen) quadratischen Platten einzeln mit Fließpapier getrocknet und sorgfältig abgerieben wurden. Die Wollfäden wurden noch warm zwischen mehreren Lagen wiederholt erneuten Fließpapieres gepreßt und dann ebenfalls sorgfältig abgerieben, bis, soweit sichtbar, kein Lanolin mehr abging. — Die Woll- und Spulproben waren vor der Einbringung in Lanolin und Öl ebenso wie die Kontrollproben bis auf $^1/_{10}$ mg genau in geschlossenen Wägegläschen gewogen; nachdem sie in der beschriebenen Art von dem überschüssigen Lanolin und Öl gereinigt waren, wurden sie sofort in die Wägegläschen zurückgebracht und wieder gewogen. Hierauf kamen die Proben, einschließlich der fettfreien Kontrollproben, ohne die Gläschen auf offenen Uhrschälchen in die feuchte Kammer, wo sie zunächst 24 Stunden verweilten. Dann wurden sie herausgenommen und wiederum in den geschlossenen Gläschen gewogen. Die Gewichtszunahme gegen die vorige Wägung gab dann das Gewicht des aufgenommenen Wassers an. Diese Wägungen wurden in 24stündigen Intervallen bis zu annähernder Konstanz wiederholt, meist war aber nach 24 bis 72 Stunden der Vorgang im wesentlichen beendet*).

Die Prozentzahlen für die Wasseraufnahme sind ohne Beziehung auf die aufgenommenen Fette berechnet worden, bedeuten also Prozente des ursprünglichen Trockengewichtes der Wollfäden und Federspulen.

Was konnte nun betreffs des Resultats vorausgesagt werden? Da Lanolin, wie wir sahen, nicht hygroskopisch ist und in den benutzten Mengen Wasser in der feuchten Kammer meßbar nicht aufnimmt, so konnte nur das Gewicht der Wolle und Spulen für die Wasseraufnahme in Betracht kommen und daher war mit Sicherheit vorherzusagen, daß die lanolinisierten (und wohl auch die

*) Wir haben nicht untersucht, wie die Wasseraufnahme in den ersten Minuten und Stunden erfolgt, was ja für die Hygrometrie hauptsächlich in Frage käme. Nach 2 Stunden war, wie hier bemerkt sei, der Unterschied der Wasseraufnahme seitens lanolinisierter, geölter und fettfreier Wollfäden in der feuchten Kammer nicht mehr sehr erheblich.

geölten) Proben prozentisch (auf fettfreies Trockenmaterial bezogen) nicht mehr Wasser aufnehmen können als die fettfreien Kontrollproben. Sodann war wohl zweifellos die fettige Oberfläche an den gefetteten Fäden und Spulen nach dem, was wir in den reinen Lanolinversuchen gesehen haben, zur „Adsorption“ entweder ganz unfähig oder doch jedenfalls weniger zur Wasserkondensation geeignet als die der fettfreien Kontrollproben. Dies konnte oder mußte eine wesentliche Verzögerung des Wasseraufnahmeprozesses, d. h. der Quellung der Keratingebilde, der Lösung des Wassers im Keratin bei den gefetteten Präparaten verursachen. Diese Frage haben wir jedoch, wie gesagt, vorläufig bei Seite gelassen, da bei der ersten Prüfung in diesen Versuchen — nach 24 Stunden — der Prozeß meist schon vollendet vorgefunden wurde. Wo dies nicht der Fall war, zeigten die gefetteten Proben die vorherzusagende Verzögerung.

Was konnte man aber bezüglich des schließlich aufgenommenen Wasserquantums bei den verschiedenen Präparaten erwarten? Ein Fließpapier, das mit Fett imprägniert ist, nimmt — praktisch gesprochen — kein Wasser, ein wassernasses Filter kein Fett auf. Aber die „Lösung“ von Wasser im hygroskopischen Materiale dürfte den Vergleich mit dem nassen Filter nicht aushalten. Und das völlig fettgetränkte Haar könnte sehr wohl noch Raum für das Wasser haben, und das völlig wassernasse Haar könnte ebensowohl in gleicher Weise noch Raum für Fett oder entgegengesetzt keinen Raum für Fett haben.

Unsere Versuche ergaben, daß die (notabene wasserfreien) fettgetränkten Wollfäden und Spulen im wesentlichen ebensoviel Wasser aus der feuchten Luft aufnehmen wie die fettlosen (gleichfalls wasserfreien) Proben. Etwa 15 bis 17 Proz. bei den Wollfäden, etwa 10 bis 12 Proz. bei den Spulen.

Dieses Resultat ist nicht bloß vom physikalisch-chemischen Standpunkte aus sehr bemerkenswert. Wir haben nämlich hier ein fundamental verschiedenes Verhalten dem Wasser gegenüber gefunden, einerseits bei Lanolin, das aus feuchter Luft keine meßbare Wassermenge aufnimmt und den völlig lanolindurchtränkten Keratingebilden, die ebensoviel Feuchtigkeit aufnehmen wie im lanolinfreien Zustande. Dies muß auch als für die menschliche Epidermis gültig in Anspruch genommen werden.

Es sind jetzt eine Reihe von Fragen zu entscheiden: Geht mit diesem Quellungswasser aus der etwa im Bade die Epidermis berührenden Salzlösung auch Salz in die Epidermis? Welches ist dann hier das elektive Verhalten des Keratins in bezug auf quale

und quantum? Hält das Keratin vielleicht gegenüber gewissen Konzentrationen, z. B. des Kochsalzes, dieses Salz in solcher Weise fest, daß die Epidermis gewissermaßen eine für Kochsalz halbdurchlässige Membran wird? usw.

Daß alle diese Fragen nur dann und dort zu stellen sind, wann und wo das Wasser wirklich an das fettimprägnierte Keratingebilde herangelangen, es benetzen kann, versteht sich von selbst. Das Sekret der Bürzeldrüse der Wasservögel, zumal der ozeanischen, hindert das Benetzen vollständig und damit fallen jene Fragen als gegenstandslos hinweg. In minder vollkommener Weise hindert beim Menschen der Hauttalg das Benetztwerden der Epidermis des Badenden. Es ist dringend zu wünschen, daß Badeärzte, die es doch zunächst angeht, die Frage der Benetzbarkeit der Menschenepidermis in exakter Weise angreifen. Die Faktoren Wärme, Badedauer usw., die individuelle und Rassenverschiedenheit usw., alles dieses gäbe wichtige Gesichtspunkte.

Von den vielen eben angedeuteten Fragen haben wir nur die nach der Salzaufnahme in Angriff genommen. Nach den Untersuchungen Hofmeisters über die Quellung und über die Salzaufnahme quellbarer Substanzen, sowie nach dem, was sonst über derartige Fragen in der physikalischen Chemie bekannt ist, war folgendes zu erwarten:

Für den Fall, daß die Keratingebilde überhaupt Salze aufnehmen, was an sich wahrscheinlich war, war es auch als wahrscheinlich zu bezeichnen, daß hier die Verhältnisse ähnlich wie bei der Gelatine sein würden, d. h., daß aus weniger konzentrierten Kochsalzlösungen verhältnismäßig viel Kochsalz aufgenommen werde, während bei zunehmender Konzentration bald ein Maximum der Kochsalzaufnahme erreicht wird. Im wesentlichen wurden diese Erwartungen bestätigt.

Etwa 2,5 bis 3 g mit Äther gereinigte und zur Konstanz getrocknete Wollfäden werden mit 4 ccm einer 0,77 proz. Kochsalzlösung in einer Flasche mit eingeschliffenem Stöpsel geschüttelt und 24 Stunden stehen gelassen; hierauf werden, da nicht genügend Lösung abgepreßt werden kann, noch 5 ccm derselben Lösung hinzugegeben; nach weiteren 15 Stunden wird Flüssigkeit abgepreßt und titriert. Die Flüssigkeit enthielt nur noch 0,6 Proz. NaCl, d. h. ihr Kochsalzgehalt hat sich verringert. (Zufällig war in diesem Versuche der Kochsalzgehalt der Wollfäden genau so groß geworden wie nunmehr in der Außenflüssigkeit, nämlich = 0,6 Proz. des Trockengewichtes.)

Ein analoges Resultat ergab folgender Versuch: 3 g Frauenhaare werden mit 9 ccm der 0,77 proz. NaCl-Lösung übergossen; die nach etwa 36 Stunden abgepreßte Flüssigkeit hatte 0,64 Proz. NaCl; also die gleiche Salzverminderung in der Lösung, bzw. die gleiche Salzanziehung seitens der Menschenhaare wie durch die Schafwolle.

In den folgenden Versuchen wurde der Salzgehalt der Wollfäden festgestellt, einmal im ursprünglichen (wasserfreien) Zustande, dann nachdem die (vorher gewogenen, wasserfreien) Fäden 24 Stunden in Kochsalzlösungen

von 0,8 und von 5 Proz. gelegen hatten; nach der Herausnahme aus diesen Lösungen waren sie sorgfältig unter möglichster Vermeidung von Wasserverdunstung wiederholentlich in Fließpapier (bis zur Trockne) gepreßt worden. Die Chlorbestimmung wurde in der gewöhnlichen Weise nach Veraschung ausgeführt. Die drei Proben enthielten an Kochsalz: 1. die unbehandelten Fäden nur Spuren; 2. die mit 0,8proz. Kochsalzlösung behandelten in 1,92 g des Trockengewichtes 0,0052 NaCl = 0,27 Proz.; 3. die aus der 5proz. Lösung genommenen in 1,83 g Trockengewicht 0,023 NaCl = 1,25 Proz. Während sich die Salzkonzentrationen der Badeflüssigkeiten (0,8 und 5 Proz.) wie 1 : 6,25 verhielten, verhalten sich die aufgenommenen Salzmengen ungefähr wie 0,27 : 1,25 = 1 : 4,6. Mit anderen Worten: aus der minder konzentrierten Lösung ist relativ mehr Kochsalz aufgenommen worden als aus der konzentrierten.

Da dem soeben besprochenen Versuche der Vorwurf gemacht werden könnte, daß Kochsalz mit bestimmt sei, das nicht im Keratin, sondern äußerlich den Wollfibrillen anhaftend gewissermaßen noch wie im Dochte befindlich nicht entfernt worden war, so wurde im folgenden Versuche statt des Abpressens zwischen Fließpapier zur Entfernung des äußerlich anhaftenden Salzwassers das Abspülen mit destilliertem Wasser angewendet. Natürlich haftete diesem Verfahren der entgegengesetzte Fehler an: es besteht die Gefahr, daß nicht bloß das äußerlich anhaftende Kochsalz, sondern auch durch Diffusion, d. h. durch Auslaugung, solches Salz entfernt werde, das im Keratin „gelöst“ ist. Da muß ja aber dann doch die Wahrheit in der Mitte liegen.

Das Ergebnis war: 4,97 g der gleichen Wolle (wie im vorigen Versuche) in 0,8proz. Kochsalzlösung 24 Stunden aufbewahrt, mit destilliertem Wasser abgewaschen und verascht enthalten 0,0023 g NaCl = 0,046 Proz. Dagegen nahmen 4,3 g Wollfäden in 5proz. Kochsalzlösung in derselben Zeit 0,0081 Kochsalz auf = 0,188 Proz. Wenn nun in diesen Bestimmungen in Folge des besprochenen Unterschiedes im Säuberungsverfahren nur etwa $^1/_7$ bis $^1/_5$ der im vorigen Versuche gefundenen Werte der Kochsalzanreicherung ermittelt wurde, so ist doch auch hier das Verhältnis der bei beiden Proben gefundenen Werte (1 : 4) im wesentlichen dasselbe wie im vorigen Versuche (1 : 4,6). Also ist auch diesmal aus der minder konzentrierten Lösung relativ mehr Kochsalz entnommen worden.

Analoge Versuche wurden mit Federspulen, die in der besprochenen Weise vorbereitet waren, angestellt. Hier waren die bei den erwähnten Säuberungs- und Trocknungsverfahren in der Wolle unvermeidbaren Fehlerquellen nicht vorhanden. Nach dem siebentägigen Bade bei 48° C (die Gründe für die Notwendigkeit einer so langen Badedauer liegen in der derben Struktur der Spulen, wie dies bereits oben erwähnt ist) kann das Material ohne Gefahr nennenswerten Verlustes an wirklich *aufgenommenem* Kochsalz mit destilliertem Wasser abgespült und dann abgetrocknet werden.

Proben ungebadeter, in 0,8proz. und in 5proz. Kochsalzlösung 7 Tage bei 48° C*) gebadeter Spulen wurden verascht. 0,4 g unbehandelter Spulen erforderten 0,2 ccm der Titrierflüssigkeit ($^1/_{10}$ n $AgNO_3$); 0,4 g der in 0,8proz. Kochsalzlösung gebadeten Federspulen erforderten 0,4 ccm derselben Titrierflüssigkeit, also doppelt so viel, und die Asche von 0,49 g Spulen, die in 5proz. Lösung gebadet hatten, beanspruchten 0,9 ccm, d. i. $2^1/_4$ mal so viel wie die 0,4 g aus dem 0,8proz. Bade und $4^1/_2$ mal so viel wie die 0,4 g ursprünglicher, nicht gebadeter Spulen. Da von den ersten und zweiten je 0,4, von den letzten Spulen 0,49 g verarbeitet waren, so reduziert sich das Verhältnis so, daß aus 5proz. Lösung nur etwa doppelt so viel wie aus 0,8proz. genommen ist, und daß aus 0,8proz. (physiologischer) Kochsalzlösung die natürlichen Spulen noch ebensoviel Kochsalz herausholen, als sie schon besitzen, also doppelt so reich daran werden.

Von den soeben besprochenen, mit physiologischer Kochsalzlösung auf das Doppelte, bzw. durch 5proz. Salzlösung auf das Vierfache angereicherten Spulen wird je eine Probe in destilliertes Wasser gelegt und nach 3 Tagen verascht. In der Asche fanden sich nur noch nicht mehr bestimmbare Mengen von Kochsalz.

Diese Befunde zusammen mit den an den gebadeten Wollfäden, die einerseits durch Abpressen, andrerseits durch Abspülen von dem anhaftenden Kochsalz befreit waren, beweisen deutlich, daß das Kochsalz im Keratin nur sehr locker sitzt und durch destilliertes Wasser und also auch durch andere salzlösende Flüssigkeiten leicht entfernt werden könnte. Wenn daher z. B. körperfremde Salze schnell genug bis in die tiefste Epidermis mit dem Wasser durch Keratinquellung eindringen könnten, so ist gar nicht abzusehen, warum sie im Corium nicht von Blut usw. aufgenommen werden sollten.

Es war nur noch festzustellen, ob die cholesterinfett-imprägnierten Keratingebilde sich in bezug auf die Salzaufnahme ebenso verhalten wie die fettfreien.

Hierüber belehrte uns folgender Versuch: Trockene Wollfäden im Gewichte von 0,432 g, desgleichen Fäden von 0,481 g, ferner 0,4814 und 0,4995, also im wesentlichen gleiche Mengen wurden lanolinisiert. Hierauf wurden sie in eine 0,4, bzw. 0,8, bzw. 5, bzw. 10proz. Kochsalzlösung (je 20 ccm) gebracht und 30 Stunden bei 32° C darin belassen; Verdunstung vermieden. Dann wurden sie herausgenommen, abgetrocknet, mit destilliertem Wasser kurz gewaschen und verascht. Die Fäden aus dem 0,4proz. Bade erforderten 0,2 ccm der Titerflüssigkeit, die aus dem 0,8proz. 0,3 ccm, die aus dem 5proz. mehr als 0,6 ccm (ein Teil des Materiales ging verloren), und die aus dem 10proz. Bade 1,8 ccm.

Wir sehen, daß auch in bezug auf Salzaufnahme aus wässeriger Lösung die Lanolinisierung der Keratingebilde kein Hindernis abgibt. —

*) Selbstverständlich war dafür gesorgt worden, daß die Lösungen nicht verdunsten konnten.

Es ist also physikalisch chemisch kein Grund vorhanden, die Aufnahme von Salzlösungen durch die menschliche Epidermis wegen deren Durchtränkung mit Lanolin von vorneherein für unmöglich zu erklären. Zieht man aber die Schnelligkeit und Zuverlässigkeit in Betracht, mit der lipoidlösliche Substanzen, z. B. Phenol, Chloroform, Cantharidin, durch die Epidermis dringen, während Salzlösungen nach den Untersuchungen Fleischers u. v. a. selbst nach 3stündigem Bade nicht durchtraten, so ist man genötigt, anzunehmen, daß die Geschwindigkeit, mit der letztere in die Epidermis dringen, außerordentlich klein ist.

Ob aber die so eindringenden Mengen stets und überall als verschwindend gering völlig zu vernachlässigen sind, dies zu entscheiden, reichen denn doch die vorliegenden wenigen und beschränkten Versuche am Menschen nicht aus. Es wäre ja möglich, daß bei einem blonden, skrophulösen Kinde die Epidermis für Salzlösungen gut permeabel ist im Vergleich zu der eines brünetten, robusten Mannes. Hierüber können nur weitere ausgedehnte Versuche Auskunft geben.

Anhangsweise sei noch darauf hingewiesen, daß auch in unserem zuletzt erwähnten Versuche mit lanolinisierten Wollfäden die Salzaufnahme bei den schwächeren Lösungen relativ größer als bei den stärkeren war.

Wie bereits oben dargelegt wurde, eignen sich für die genaue Bestimmung der aufgenommenen Salzmengen die Federspulen besser als Wollfäden, da sie ohne wesentliche Fehler gesäubert werden können. Wir haben daher den gleichen Versuch mit Federspulen vorgenommen und zwar haben wir die Lanolinisierung unterlassen, da ja nunmehr erwiesen ist, daß diese an dem definitiven Resultate nichts ändert.

Die Badezeit betrug auch hier wieder 8 Tage. Pro 1 g Substanz wird bei 0,4proz. Kochsalzlösung 0,1 bis 0,2 ccm, bei 0,8proz. 0,4 ccm, bei 5proz. 1,8 ccm, bei 10proz. 2 ccm Titerflüssigkeit verbraucht.

Innerhalb der praktisch-balneologisch in Betracht kommenden Konzentrationen der Kochsalzlösungen (0,4 bis 10 Proz.) nimmt also mit steigendem Kochsalzgehalt die absolute Menge des vom Keratin aufgenommenen Kochsalzes zu; indessen ist der Unterschied zwischen der Aufnahme bei 5 und bei 10 Proz. schon sehr gering.

Kürzere Mitteilungen.

Bemerkungen zu der Abhandlung von O. Schumm: „Über ein proteolytisches Ferment im Blute bei Leukämie."

Von Dr. **Franz Erben,**
derzeitigem Assistenten der Klinik v. Jaksch in Prag.

O. Schumm hat in einer mir soeben bekannt gewordenen Abhandlung*), auch bezugnehmend auf meine Ausführungen in meiner Abhandlung: „Zur Kenntnis der chemischen Zusammensetzung lymphämischen Blutes**), Versuche darüber angestellt, ob meine Annahme, es sei ein proteolytisches Ferment wahrscheinlich die Ursache der Peptonbildung im leukämischen Blute, richtig sei. Der Weg, den Schumm einschlug, war der des Nachweises verschiedener Verdauungsprodukte des Eiweißes. Schon Matthes hatte im lebenden leukämischen Blute ein solches Verdauungsprodukt, eine Deuteroalbumose, gefunden. Schumm gelang es nun, in zwei Fällen typischer myelogener Leukämie eine ganze Reihe solcher Produkte, nämlich primäre und sekundäre Albumosen, Pepton (in einem Falle) und endlich auch mehr oder weniger Leucin und Tyrosin nachzuweisen. Daraus schließt der Autor mit Recht, daß im leukämischen Blute ein proteolytisches Ferment vorhanden sein müsse, dessen Tätigkeit diese Produkte der Eiweißspaltung entspringen.

Schumm ist es aber entgangen, daß ich schon Ende 1901 auf einem viel direkteren Wege zu demselben Resultate gekommen bin.

Es gelang mir nämlich, direkt aus einem leukämischen Blute proteolytisches Ferment darzustellen und damit Verdauungsproben mit Fibrin anzustellen. Ich habe über diesen Fund in der Sitzung der k. k. Gesellschaft der Ärzte in Wien vom 28. Februar 1902 eine kurze Mitteilung***) gemacht und über meine Versuche später ausführlicher berichtet†).

In Kürze waren es folgende:

Leukämisches, von Erythrocyten möglichst befreites Blut, also Plasma plus Leukocyten, das frisch nach der Entnahme aus der Vene nur zweifelhafte Spuren von unkoagulablen Eiweißkörpern enthielt, wurde 70 Stunden im Brutkasten stehen gelassen. Hiernach gab es, obwohl vollständig steril

---

*) Diese Beiträge 4, 442 (1903).

**) Erben, Zeitschrift für klinische Medizin 40, 282--293 (1900).

***) Siehe das offizielle Protokoll der Sitzung in der Wiener klinischen Wochenschrift 15, 276 (1902).

†) Erben, Zeitschrift für Heilkunde 24, 70–79 (1903).

geblieben, deutliche Reaktionen von Albumosen und Pepton. Nachdem so der Nachweis einer postmortalen Bildung dieser Körper geführt war, ging ich daran, das Ferment als solches zu isolieren. Plasma-Leukocytengemisch von leukämischem Blute wurde mit Alkohol gefällt. Der entstandene Niederschlag wurde nach mehrmonatlichem Stehen unter Alkohol abfiltriert und mit Glycerin extrahiert. Dieses Glycerinextrakt verdaute nun Fibrin gut in 3 ‰ Sodalösung, langsamer und schlechter, aber doch merklich, in 3‰ HCl-Lösung (bei Chloroformzusatz). Das Extrakt enthielt sonach ein tryptisches und auch in geringen Mengen ein peptisches Ferment.

Ein weiterer Versuch ergab, daß das Serum fermentfrei war, das Ferment also an die Leukocyten gebunden sein müsse. Mikroskopische Untersuchungen bei Brutwärme gehaltener leukämischer Leukocyten lehrten, daß die eosinophilen Zellen gut erhalten, die neutrophilen hingegen bis auf ihre Kernfragmente zerstört waren. Diese Beobachtung veranlaßte mich im Zusammenhalt mit dem von Achalme*) nachgewiesenen Fermentgehalt der Eiterzellen und meiner**) Beobachtung, daß in lymphämischem Blute auch nach längerem Stehen bei 30° C keine unkoagulablen Eiweißkörper entstünden, zu dem Schlusse, daß die neutrophilen Zellen als die Fermentträger anzusehen seien.

Im Blute anderer Provenienz konnte weder Ferment noch auch nach Stehenlassen bei Brutwärme Albumose oder Pepton gefunden werden.

Da in normalem Blute, in das doch jedenfalls Fermente aus dem Verdauungstrakte gelangen, diese weder nach dem Absterben (Erben) noch nach dem Faulen (Wagner***) zur Wirkung gelangen, so schloß ich weiter, daß die Peptonbildung durch Fermentwirkung nichts andres als der Ausdruck einer pathologischen Veränderung der Leukocyten myelämischen Blutes sei.

Es bilden also die Resultate Schumms eine schöne Bestätigung meines Fundes und eine Erweiterung meiner Versuche, insofern als nun auch die Bildung einiger weiterer Spaltungsprodukte durch das von mir im leukämischen Blut gefundene Ferment nachgewiesen worden ist.

Prag, am 26./IV. 1904.

---

*) Achalme, C r. 51, 568.

**) Erben, loc. cit.

***) Wagner bei v. Jaksch, Zeitschrift für physiologische Chemie 16, 252 (1892).

XXXI.

Zur Lehre von der Milchbildung.

Von Dr. **Paul Hildebrandt.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

I. Autolyse der ruhenden und der tätigen Milchdrüse.

Die Frage nach der Herkunft und Entstehung des Milchkaseins ist oft erörtert, aber trotz der mannigfachsten Bemühungen bis heute nicht gelöst worden. Bei den einschlägigen Forschungen ging man wohl meistens von der Vorstellung aus, daß durch ein in der Milchdrüse gebildetes Ferment ein sei es der Drüse selbst angehöriger, sei es mit dem Blut zugeführter Eiweißkörper in Kasein übergeführt würde.

Dähnhardt*) glaubte bereits ein Ferment aus tätigen Meerschweinchendrüsen extrahiert und damit aus Eieralbumin unter Zusatz einiger Tropfen 10-proz. kohlensauren Natrons nach 18stündiger Digestion eine mit Kasein identische Substanz erhalten zu haben. Seine Ergebnisse wurden aber von späteren Untersuchern**) nicht bestätigt und beruhten wohl auf einer Gleichstellung von Alkalialbuminat und Kasein.

Nachdem dann Schmidt-Mülheim***) entgegengesetzten Behauptungen Kemmerichs†) gegenüber nachgewiesen hatte, daß eine Vermehrung des Kaseingehaltes in der entleerten Milch nicht statthat, dieser vielmehr proportional der Dauer der Digestion abnimmt, während der Albumingehalt sich nicht ändert, nahm Thierfelder in seiner Dissertation 1883 die Frage der Kaseinbildung wieder auf. Er bestätigte zunächst, daß auch im Colostrum beim Digerieren der Kaseingehalt abnimmt. Setzte er jedoch Blutserum derselben Tierart zu frischgemolkener Milch, so nahm das Kasein — oder ein anderes Kalialbuminat (loc. cit.

---

*) Dähnhardt, Pflügers Arch. 3, 586 (1870). — Beiträge zur Kenntnis der Entstehung einiger Milchbestandteile. Diss. Rostock 1883.

**) Thierfelder Diss. Vers. 38.

***) Schmidt-Mülheim, Pflügers Arch. 28, 243 und 287 (1882).

†) Kemmerich, Pflügers Arch. 2, 401 (1869).

S. 33) — bei der Digestion von 0,732 auf 0,760, bzw. von 0,54 auf 0,56 zu. Ebenso erhielt er geringere Werte, wenn er Milch und Serum getrennt digerierte, als wenn er sie zusammen ansetzte: 0,72 gegen 0,79 und 0,56 gegen 0,65.

Schließlich wurde noch Milchdrüsenbrei von Kaninchen, die vor 2 Tagen geworfen hatten, teils mit Kochsalzlösung, teils mit Kaninchenblutserum angesetzt, 3 Stunden digeriert und mit der 20fachen Menge Kochsalzlösung extrahiert. Es wurden nachstehende Zahlen erhalten:

frisch untersucht	1,52 Proz.
getrennt digeriert	1,69 „
zusammen digeriert	1,88 „

und bei einem zweiten Versuch

frisch untersucht	2,265 Proz.
zusammen digeriert.	2,41 „

Thierfelder glaubt danach, daß durch ein Ferment der Milchdrüse, das in die Milch übergeht, Serumalbumin, nicht aber Lactalbumin, in Kasein übergeführt werden könne.

Hammarsten spricht sich 1899 in seinem Lehrbuch der physiol. Chemie über die Entstehung des Kaseins folgendermaßen aus: „Besser begründet scheint die Ansicht zu sein, daß das Kasein aus dem Protoplasma der Drüsenzellen abstamme. Das (besprochene) Nucleoproteid der Drüsenzellen dürfte dem Kasein verwandt sein, und es könnte vielleicht die Muttersubstanz desselben darstellen. Daß das Protoplasma der Zellen an der Sekretion in der Weise beteiligt ist, daß es selbst zu Sekretbestandteilen wird, scheint auch in Übereinstimmung mit der Ansicht von Heidenhain*) allgemein angenommen zu sein. Nach den Untersuchungen von Basch soll das Kasein in der Milchdrüse dadurch entstehen, daß die Nucleinsäure des freigewordenen Kernes intraalveolär mit dem transsudierten Serum zu einem Nucleoalbumin, dem Kasein, sich verbindet; es können aber gegen diese Untersuchungen wichtige Einwendungen erhoben werden."

K. Basch gibt an**), daß wenn er die Nucleinsäure der Milchdrüse in saurer Lösung auf Rinderblutserum einwirken ließ, er einen Körper erhielt, der die gleichen chemischen und physikalischen Eigenschaften, wie Kuhkasein darbot, die gleiche Löslichkeit und Opaleszenz mit Kalksalzen zeigte und im Brutschrank typische Labgerinnung gab, welche für das Kasein so charakteristisch sei, daß sie allein zur Identifizierung genüge. Er hebt ferner

*) Heidenhain, Hermanns Handbuch 5, 1, 380.

**) Ergebnisse der Physiologie herausg. von Asher u. Spiro 2, 2. Abt., 372.

hervor, daß die Nucleine, die er aus der Substanz der Milchdrüse gewinnen konnte, bei ihrer Zersetzung mit Salzsäure ebensowenig Xanthinbasen liefern, als das Kasein selbst, und daß sie in gleicher Weise wie Kasein auch keine reduzierende Substanz abspalten.

Da man mit einer gewissen Berechtigung in der Autolyse ein Mittel sehen darf, mit welchem man bestimmte chemische Vorgänge in der Zelle auch nach dem Tode weiterzuführen imstande ist, so konnte man hoffen, sie für die vorliegende Frage mit Nutzen verwenden zu können.

A. Produkte der Autolyse des Kuheuters.

Es standen mir zunächst für eine vorläufige Untersuchung autolytische Präparate von Kuheuter zur Verfügung, die in folgender Art erhalten waren:

Die Kuheuter wurden nach sorgfältiger Präparierung in der Fleischhackmaschine zerkleinert, mit 2 Litern Wasser auf 2 Kilogr. Gewebe und etwa 100 ccm Toluol in der Schüttelmaschine mehrere Stunden geschüttelt, dann mit einer querfingerhohen Schichte Toluol überschichtet. Das gut verkorkte Gefäß wurde etwa 1 Jahr lang bei 37°, ein weiteres Jahr hindurch bei Zimmertemperatur gehalten. Zur Untersuchung auf die durch Autolyse gebildeten Produkte wurde die ungelöst gebliebene Drüsenmasse durch Kolieren und Auspressen von der Flüssigkeit getrennt und diese bis zur völligen Klarheit filtriert.

Von den in Lösung befindlichen Stoffen zog ein durch Essigsäure fällbarer, nicht im Überschuß der Säure, wohl aber in Ammoniak leicht löslicher Eiweißkörper am meisten die Aufmerksamkeit auf sich. Er hatte sich in einer Reihe von Vorproben autolysierter Milchdrüsen stets gefunden und es war an einen Zusammenhang mit dem Kasein, vielleicht an eine Vorstufe desselben, zu denken. Nachdem er durch wiederholte Fällung mit Essigsäure und Lösung in Ammoniak möglichst gereinigt worden war, ergab sich, daß die Phosphorreaktion negativ ausfiel. Es handelte sich also nicht etwa um ein Nucleoproteid, wie es Odenius*) beschrieben hat. Die Biuretreaktion war stark positiv; die Millonsche und auch die Adamkiewiczsche Probe, bzw. deren Modifikation mit Glyoxylsäure nach Hopkins fiel deutlich positiv aus. Die Reaktion nach Molisch fehlte; Schwefel wurde sowohl durch Natronlauge und Bleiacetat, wie auch durch Schmelzen mit Salpetermischung, Ansäuern und Versetzen mit Baryumchlorid nachgewiesen. In Ammoniak gelöst, wurde der Eiweißkörper durch Hitze nicht verändert; bei Zusatz von Essigsäure fiel er dann aus und ließ sich jetzt durch erhöhte Temperatur zu einer echten Koagulation bringen, so daß der Niederschlag in Ammoniak nicht

*) Odenius, Malys Jahresber. 30, 39 (1900).

wieder löslich war. Alkohol erzeugte in der alkalischen Lösung keinen Niederschlag; dagegen gab ein Zusatz von mehr als dem halben Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung Fällung. In verdünnter Natronlauge löste sich der einmal getrocknete, nicht erhitzte Eiweißkörper ziemlich schwer. Der negative Ausfall der Reaktion von Molisch und die Fällungsverhältnisse lassen eine Beziehung zum Kasein möglich erscheinen, doch genügen diese Anhaltspunkte nicht zu weiteren Schlußfolgerungen.

Von anderen in der autolytischen Flüssigkeit befindlichen Stoffen konnten nachgewiesen werden: ein durch Erhitzen koagulabler, durch Säure nicht fällbarer Eiweißkörper, alkoholfällbare und alkohollösliche Albumosen, Leucin und Tyrosin; auf Zitronensäure wurde ohne Erfolg gefahndet. Im Alkoholauszug fand sich keine reduzierende Substanz.

Die gefundenen Produkte zeigen, daß das Milchdrüsengewebe proteolytische Fermente enthält, die einerseits dem Trypsin, andererseits den autolytischen Fermenten anderer Gewebe, z. B. der Leber nahe stehen. Daß es sich aber nicht allein um das Vorkommen eines ganz allgemein verbreiteten autolytischen Ferments handelt, vielmehr ein Zusammenhang mit der spezifischen Tätigkeit der Drüse besteht, wird durch den Umstand nahe gelegt, daß die tryptische Wirkung des Drüsengewebes von seinem Funktionszustand abhängt.

Bei weiterem Arbeiten bekam ich nämlich zufällig ein Kuheuter unter die Hände, das auf der Höhe der Sekretion stand Die Milch wurde daraus so vollständig wie möglich ausgewaschen und dann die Drüsensubstanz in der beschriebenen Weise zur Autolyse angesetzt. Nach 2 Monaten ergab die sauer reagierende autolytische Flüssigkeit weder durch Essigsäure, noch durch Erhitzen, noch auf reichlichsten Zusatz gesättigter Ammonsulfatlösung irgend welche Fällung.

Alkoholzusatz gab eine wolkige Trübung. Millons Reaktion war positiv, die Biuretreaktion schwach. Abspaltbarer Schwefel wurde nachgewiesen. Kupferoxyd wurde reduziert. Die Flüssigkeit enthielt Phosphate und Calcium. Sämtliches koagulables Eiweiß war mithin in dieser tätigen Milchdrüse während der zweimonatlichen Autolyse aufgespalten worden: die sonst nachweisbare kaseinähnliche, aber phosphorfreie Substanz war entweder nicht gebildet, oder nachträglich verdaut worden.

Die proteolytischen Fermente sind also in der tätigen Brustdrüse im Vergleich zur nicht sezernierenden ganz außerordentlich vermehrt.

Ich achtete demgemäß auch auf das Vorhandensein anderer Fermente. Der Nachweis eines Blutgerinnungsferments, eines peptischen Ferments oder einer Oxydase gelang mit dieser autolytischen Flüssigkeit nicht. Da jedoch an die Möglichkeit zu denken war, daß die genannten Fermente bereits zu Grunde

gegangen waren, wurden in ganz frischem Milchdrüsenbrei und in solchem, welcher 2 Tage im Brutschrank gestanden hatte, also voraussichtlich auf der Höhe seiner fermentativen Tätigkeit war, Mettsche Röhrchen mit koaguliertem Pferdeblutserum 24 Stunden lang teils mit, teils ohne Säurezusatz im Brutofen digeriert: Die Eiweißsäule war danach nicht im geringsten angegriffen.

Der mit gleichem Drüsenbrei versuchte Nachweis einer Indophenol-Oxydase mit α-Naphtol und Paraphenylendiamin schlug gleichfalls fehl, während er mit gewöhnlicher Milch vorzüglich gelang. Ein labendes Ferment, dessen Anwesenheit ja a priori unwahrscheinlich war, konnte in dem Preßsaft frischen Kuheuters, das unter 150 Atmosphären Druck gestanden, gleichfalls nicht nachgewiesen werden.

B. Die Abhängigkeit der Proteolyse von der Drüsentätigkeit.

Der oben erwähnte in die Augen springende Unterschied des Gehalts an proteolytischen Fermenten in einer laktierenden und einer ruhenden Milchdrüse veranlaßte mich, diese Verschiedenheiten durch quantitative Bestimmungen des in Lösung gegangenen, nicht koagulablen Stickstoffs zahlenmäßig festzustellen. Nun hat man bei der Marktware des Schlachthauses allerdings den Vorteil, das Material frisch zu bekommen, aber dem steht unzweifelhaft der Nachteil gegenüber, daß man nur unterscheiden kann zwischen Eutern, deren Sekretion man makroskopisch nicht wahrnimmt und solchen, in denen man, wenn auch nur geringe Spuren Milch findet. Über diese ganz grobe Unterscheidung hinaus festzustellen, ob das Tier schwanger oder puerperal war, oder wie viel Zeit seit dem regelmäßigen Melken oder Saugen bereits verstrichen ist, erlauben die Verhältnisse in der Regel nicht.

Zu meinen Bestimmungen setzte ich je 50 g zerkleinerten, von Fett und Bindegewebe möglichst vollständig befreiten Drüsengewebes mit der gleichen Menge Wassers und Toluol im Überschuß zur Autolyse an. Behufs Verarbeitung wurde dann die autolysierte Masse nach Ansäuern mit 5 ccm n-Essigsäure durch Erhitzen koaguliert, auf 130 ccm aufgefüllt und dann filtriert. 40 ccm des Filtrats wurden mit 20 ccm gesättigter Zinksulfatlösung versetzt und die Probe dann so lange filtriert, bis sie absolut klar war. Von dem klaren Filtrat wurden dann je 20 ccm zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl genommen. Es wurden stets Doppelbestimmungen ausgeführt.

Da es sich um Vergleiche bei denselben Versuchsanordnungen handelt, teile ich die gefundenen Werte für Ammoniak in ccm $^{n}/_{10}$ Lösung mit. Das angeführte Volum des Koagulationsrückstands soll eine annähernde Vorstellung von dem erreichten Grade der Verdauung auf anderem Wege vermitteln.

I. Versuch.

Ruhende Drüse.

Dauer der Autolyse	a) Reaktion amphoter		b) Vor der Autolyse angesäuert		c) Vor der Autolyse alkalisch gemacht	
	Volum des Rückstands	ccm $n/_{10}$ NH_3	Volum des Rückstands	ccm $n/_{10}$ NH_3	Volum des Rückstands	ccm $n/_{10}$ NH_3
	ca. 56 ccm	4,8				
36 Stunden		11,0	ca. 50 ccm	21,8	ca. 60 ccm	7,0
9 Tage		13,7	„ 46 „	31,0	„ 60 „	9,15
20 „		14,3	„ 43 „	32,8	„ 56 „	12,0
52 „		17,5		37,5		16,5

II. Versuch.

Schwach sezernierende Drüse.

Dauer der Autolyse	Volum des Rückstands	Reaktion	ccm $n/_{10}$ NH_3
	ca. 50 ccm	amphoter	8,5
36 Stunden	„ 50 „	„	14,0
5 Tage	„ 50 „	„	14,4
8 „	„ 50 „	„	16,1
13 „	„ 48 „	„	16,3
19 „	„ 30 „	sauer	24,2
28 „	„ 30 „	„	32,0
62 „	„ 27 „	„	35,4

III. Versuch.

Stärker sezernierende Drüse.

Dauer der Autolyse	ccm $n/_{10}$ NH_3
—	9,5
5 Tage	22,1
15 Tage	31,1
Vor der Autolyse angesäuert	
15 Tage	40,5
Vor der Autolyse alkalisch gemacht	
15 Tage	22,2

Aus den angeführten Zahlen ersieht man deutlich, daß die Stärke der Fermentwirkung in den verschiedenen Drüsen etwa der Intensität der Sekretion entspricht.

Noch deutlicher tritt dieser Unterschied bei der Untersuchung von menschlichen Brustdrüsen hervor. Hier ist eine Feststellung des Sekretionsstadiums mit aller Genauigkeit durchführ-



bar. Allerdings liegt bei der Gepflogenheit, Sektionen meist erst 12 bis 24 Stunden nach erfolgtem Tode vorzunehmen, die Gefahr einer Störung durch bakterielle Zersetzung nahe, doch zeigte der Versuch, daß bei entsprechendem Vorgehen dieser Umstand keine Rolle spielt. Der Liebenswürdigkeit des Herrn Professor von Recklinghausen habe ich das verwendete Material zu verdanken.

Es wurden 7 Versuchsreihen an Drüsen von Frauen, die nach der Geburt gestorben waren, ausgeführt und 2 Versuchsreihen an Drüsen von nicht schwangeren Frauen. Von den ersteren wurden drei Reihen ausgeschaltet, weil einzelne Proben wegen Verdunstung des Toluols nicht die Sicherheit voller Asepsis zu bieten schienen. Doch wurden die Stickstoffbestimmungen der unbeschädigten Autolysate zur Kontrolle durchgeführt und stimmten ganz mit den übrigen Resultaten überein.

IV. Versuch.

Puerpera, 4 Wochen nach der Geburt an Sepsis gestorben.

Am 1. Tage . . . . 13,8 ccm $^n/_{10}$ NH_3
„ 2. „ . . . . 23,8 „ „ „
„ 8. „ . . . . 33,4 „ „ „
„ 19. „ . . . . 32,0 „ „ „

V. Versuch.

Mehrgebärende, kurz nach der Geburt gestorben.

Am 1. Tage . . . . 12,2 ccm $^n/_{10}$ NH_3
„ 3. „ . . . . 27,1 „ „ „
„ 8. „ . . . . 28,1 „ „ „
„ 16. „ . . . . 30,1 „ „ „
„ 29. „ . . . . 32,5 „ „ „

VI. Versuch.

Mehrgebärende, kurz nach der Geburt gestorben.

Am 1. Tage . . . . 10,6 ccm $^n/_{10}$ NH_3
„ 3. „ . . . . 20,7 „ „ „
„ 22. „ . . . . 22,9 „ „ „
„ 26. „ . . . . 20,3 „ „ „

VII. Versuch.

Erstgebärende, einen Tag nach der Geburt gestorben.

Am 1. Tage . . . . 11,4 ccm $^n/_{10}$ NH_3
„ 3. „ . . . . 20,3 „ „ „
„ 6. „ . . . . 22,7 „ „ „
„ 13. „ . . . . 25,6 „ „ „
„ 25. „ . . . . 27,0 „ „ „

VIII. Versuch.

30jährige nichtschwangere Frau.

Am 1. Tage . . . . 9 ccm $^n/_{10}$ NH_3
nach 34 Stunden . . . . 5,4 „ „ „
Am 9. Tage . . . . 4,4 „ „ „
„ 13. „ . . . . 8,2 „ „ „

IX. Versuch.

28jährige nichtschwangere Frau. Eine Probe angesäuert.

Am 1. Tage . . .	10,2 ccm $^n/_{10}$ NH_3	
„ 4. „ . . .	5,2 „ „ „ . . .	10,8 ccm $^{n1}/_{10}$ NH_3
„ 10. „ . . .	6,7 „ „ „ . . .	12,0 „ „ „
„ 21. „ . . .	7,0 „ „ „ . . .	13,8 „ „ „

Der Unterschied zwischen Drüsen von Frauen, welche sich in irgend einer Phase der Gestation befinden (Gravidität oder Wochenbett), und von Nichtschwangeren ist, wie man sieht, schlagend genug. Während bei der Autolyse der letzteren Reihe der nicht koagulable Stickstoffgehalt einige Tage sogar abnimmt, dann allmählich wieder ansteigt, sodaß man hiernach sogar an die Möglichkeit eines aufbauenden Fermentes denken könnte, überwiegt bei der ersten Reihe der Abbau weitaus.

Der quantitative Versuch bestätigt sonach das oben angeführte Ergebnis der qualitativen Versuche, wonach die tätige Drüse an proteolytischem Ferment viel reicher ist, als die ruhende. Man muß daran denken, daß dieses Ferment bei der Bildung von Kasein aus den den Drüsenzellen mit dem Blute zugeführten Eiweißstoffen beteiligt sein kann, etwa in der Art, wie ja auch sonst im Körper eine Assimilierung körperfremder Eiweißstoffe zustande kommt, indem nämlich zunächst die drüsenfremden Eiweißstoffe durch Proteolyse zu einfacheren Komplexen zerfallen, die dann in geeigneter Auswahl durch einen synthetischen Vorgang zu den typischen Eiweißkörpern der Milch zusammentreten.

Die Abhängigkeit der Fermenttätigkeit der Drüse von deren funktioneller Leistung legte die Frage nahe, ob nicht Stoffe, welche von den Gestationsorganen gebildet und den Milchdrüsen zugeführt werden, irgend welchen Einfluß auf die chemischen Vorgänge in diesen entfalten.

Aus der Grazer Frauenklinik hatte Matthes 1902 über Placentarautolyse berichtet, die er quantitativ nach der Stärke der Devotoschen Albumosenreaktion schätzte.

Durch gemeinsame und getrennte Autodigestion von Placenta und Milchdrüse konnte darüber vielleicht Aufschluß gewonnen werden, ob nicht die Placenta an der Drüsentätigkeit Anteil hat. Zugleich war so Gelegenheit gegeben, die Matthesschen Angaben mit einer exakteren quantitativen Methode nachzuprüfen.

Gerade Placenta und Milchdrüsen mit einander in Beziehung zu bringen, war des weiteren auch durch die Mitteilung von Bouchacourt*) nahegelegt, wonach es gelingen sollte, durch Fütterung mit

*) Bouchacourt, Compt. rend. Soc. Biol. 54, 133.

Schafsplacenta den Milchertrag von Frauen zu steigern. Freilich wurde ihm bald widersprochen, auf Grund mehr theoretischer Betrachtungen von de Sinéty*), auf Grund praktischer Nachprüfung von Fieux**), der diese Milchvermehrung nicht mit Sicherheit fand.

Die Placenta wurde frisch nach einer normalen Geburt verarbeitet, das Blut durch Ausdrücken möglichst entfernt und Eihäute und Nabelschnur entfernt. Das übrige geschah wie bei den Drüsen.

X. Versuch.

25 g Placenta		25 g Milchdrüse	25 g Placenta + 25 g Milchdrüse
Dauer der Autolyse	ccm $^n/_{10}$ NH_3	ccm $^n/_{10}$ NH_3	ccm $^n/_{10}$ NH_3
—	4,1	5,7	—
10 Stunden	6,0	10,15	12,4
7 Tage	6,0	11,35	15,05
13 „	6,8	12,8	20,6
24 „	6,65	13,5	20,15

Aus den gefundenen Zahlen ist ersichtlich, daß eine Steigerung durch die Heterolyse nicht eintritt. In den ersten Tagen zeigt sich sogar in dem Organgemisch eine unverkennbare Hemmung der autolytischen Tätigkeit, doch gleicht sich der Unterschied später völlig aus. Im übrigen bleibt die selbstverdauende Kraft der Placenta gegenüber der Milchdrüse auffällig zurück.

C. Einiges über die Eigenschaften des proteolytischen Fermentes.

Der Verlauf der Eiweißspaltung zeigt in den Versuchen mit Kuheuter eine Eigentümlichkeit. Sie geht in den ersten 30 Stunden mit ziemlicher Intensität vor sich, macht dann eine Reihe von Tagen keine nennenswerten Fortschritte, setzt aber dann plötzlich unter Auftreten saurer Reaktion mit erneuter Energie ein. In der Tat kann man zeigen, daß diese beiden Erscheinungen in ursächlichem Zusammenhang stehen. Durch künstlichen Säurezusatz, — ich verwendete in der Regel 5 ccm n-Essigsäure — kann man den autolytischen Prozeß so stark steigern, daß die Eiweißspaltung in einer ruhenden Milchdrüse mit einer Raschheit stattfindet, welche die einer tätigen, nicht mit Säure versetzten Drüse hinter sich lassen kann.

*) de Sinéty, Compt. rend. Soc. Biol. 54, 219.

**) Fieux, Bulletin med. 1903, Nr. 66, citiert nach Berl. klin. Wochenschr. Liter. Beilage 1904, Nr. 3.

Über die hemmende Wirkung zugesetzten Alkalis — meist verwendete ich 5 ccm n-Natronlauge, — die gleichfalls aus meinen Versuchen ersichtlich ist, hatte gelegentlich schon Schwiening*) 1894 auf Grund von 2 Experimenten mit dem intrazellulären Leberferment berichtet. Der Einfluß der Säurewirkung ist auch an menschlichen Drüsen (vergl. Versuch IX) nachweisbar. Dabei scheint es sich nicht um Aktivierung eines Profermentes, d. h. die Neubildung eines Fermentes zu handeln, das etwa dann bei amphoterer oder alkalischer Reaktion seine volle Tätigkeit ebensogut entfaltete, wie bei saurer (vergl. Versuch XI). Es verdient hervorgehoben zu werden, daß, wie oben bereits bemerkt, auch bei alkalischer Reaktion die autolytische Eiweißspaltung vor sich geht und daß bei amphoterer Reaktion die Fermentationskraft der laktierenden Milchdrüse stets eine bedeutend größere ist, als die der ruhenden.

Ob dieser Umstand, zusammengehalten mit der Form der Autolysekurven, genügt, zwei verschiedene Fermente anzunehmen, deren eines bei alkalischer, bzw. neutraler, das andere aber bei saurer Reaktion wirksam ist, lasse ich offen. Daß die Reaktion jedenfalls nicht allein für die verschiedene Intensität der Autolyse verantwortlich zu machen ist, davon geben die bezüglichen Zahlen deutlich Rechenschaft.

Oben wurde bereits bemerkt, daß das proteolytische Ferment des Kuheuters keinerlei Wirkung auf koaguliertes Pferdeserum ausübt. Um zu sehen, ob es spezifisch auf Eiweißkörper der Milchdrüse wirkt, oder auch Bluteiweiß derselben Spezies angreift, wurde Drüsenbrei mit frischem Rinderserum angesetzt. Doch hatte dieser Zusatz nicht nur keine gesteigerte Spaltung zur Folge, sondern äußerte sogar einen hemmenden Einfluß, was an die antitryptische Wirkung des Blutserums erinnert.

XI. Versuch.

Sezernierende Drüse.

Tag	In gewöhnlicher Weise mit Wasser autolysiert.	Mit 50 ccm Rinderserum autolysiert.
1.	9,5 ccm $^{n}/_{10}$ NH_3	10,5 ccm $^{n}/_{10}$ NH_3
5.	22,1 „ „	21,0 „ „
15.	31,1 „ „	—
20.	—	24,0 „ „

*) Schwiening, Virchows Arch. 136, 373.

Zwei Proben wurden beim Ansetzen zur Autolyse (mit Serum) mit je 5 ccm n/10 HCl durchgeschüttelt, 15 Minuten lang stehen gelassen, dann mit 5 ccm n/10 NaOH zurücktitriert.

5. Tag: 19,8 ccm n/10 NH_3

20. „ 25,0 „ „

Eine Probe wurde beim Ansetzen zur Autolyse (mit Wasser) mit 5 ccm n/10 HCl durchgeschüttelt, 15 Minuten lang stehen gelassen, und mit NaOH alkalisch gemacht.

15. Tag 19,0 ccm n/10 NH_3.

Um zu prüfen, ob nicht bei der Autolyse der Milchdrüsen eine eiweißfällende Säure (etwa nach Art einer Nucleinsäure) entsteht, auf deren Anwesenheit etwa die Bildung des eingangs beschriebenen kaseinähnlichen Eiweißniederschlags zu beziehen wäre, habe ich folgenden Versuch ausgeführt. Sein Resultat spricht nicht für eine solche Vorstellung.

Es wurde die gleiche Menge verdünnter Essigsäure getan zu:

1 ccm Kuhblutserum + 1 ccm Wasser: keine Fällung

1 „ „ + 1 „ Autolysensaft (2 Monate alt): keine Fällung

1 „ Autolysensaft + 1 „ Wasser: keine Fällung

1 „ frischer Preßsaft aus Kuheuter: schnelle Fällung

1 „ „ „ + 1 ccm Kuhblutserum: Trübung, die sich allmählich zu einer wenig voluminösen Fällung gestaltet, wie im Preßsaft. Nach 24 Stunden war in der Menge des Niederschlags keine Differenz mehr erkennbar.

II. Über die Auslösung der Milchsekretion.

Die Sekretion der Milchdrüsen wird in der Regel durch Reize, welche aus der Genitalsphäre stammen, eingeleitet, so die bei Myomen beobachtete Ausscheidung*), vor allem aber die sogenannte Colostrumbildung im Laufe der Schwangerschaft. Eine eigentliche Milchbildung größeren Stils findet aber erst einige Tage nach erfolgter Geburt statt.

Man hat nun die wässerige Colostrumabsonderung mit einer mangelhaften Drüsensekretion und ungenügender Entleerung gleichgestellt oder wenigstens in engste Beziehung gebracht. Es ließ sich mithin daran denken, daß sich nach möglichst hoher Entwickelung des anatomischen Drüsensubstrats, wie sie sich im Laufe der Schwangerschaft einstellt, durch künstliche Anregung und Absaugen des Brustdrüsensekrets eine Milchbildung hervorrufen ließe.

Ein Versuch, den ich in der Lage war, in dieser Richtung anzustellen, gab ein entschieden gegen diese Vorstellung sprechendes Resultat.

---

*) H. W. Freund, cit. nach Winckels Handbuch für Geburtshilfe S. 606.

Eine 21jährige, zum zweiten Male schwangere Frau stellte sich mir zu den entsprechenden Erhebungen zur Verfügung. Sie legte in der letzten Woche der Gravidität täglich regelmäßig alle 3 Stunden ein kräftiges Kind an. Die Brüste schwollen deutlich an und nach 2 Tagen fühlte sie bereits in typischer Weise „das Einschießen in die Brust". Eine Wägekontrolle des Kindes ergab, daß es am dritten Tage bei einem Anlegen 30 g getrunken hatte. Die Brüste füllten sich regelmäßig immer wieder, sodaß sich die Frau veranlaßt sah, das Kind bis zum Eintritt ihrer Niederkunft weiter zu säugen, um die durch die Spannung verursachten Schmerzen in den Brüsten zu vermeiden. Stets aber blieb das Sekret eine durchaus wässerige Flüssigkeit, die am 7. Tag, einen Tag vor erfolgter Entbindung, im Mikroskop Fettkügelchen von ganz verschiedener Größe und Colostrumkörperchen zeigte. Wenn man diese letzteren ja auch als scharfes Unterscheidungsmerkmal zwischen Colostrum und Milch fallen lassen kann [Opitz]*), so entscheidet doch hier die beständig gleiche makroskopische Beschaffenheit der ausgeschiedenen Flüssigkeit.

Erst am 3. Tag nach der Entbindung trat dann, genau wie bei den andern Frauen, die charakteristische weiße Milch auf.

Die Auslösung der Milchsekretion auf eine rein nervöse Ursache zurückzuführen, scheint mir nach den Arbeiten Minorows**), Pfisters***) und Ribberts†) nicht mehr gerechtfertigt. Die Annahme, daß Stoffe, die sich in dem sich involvierenden Uterus bilden und durch das Blut in die Drüse gelangen, hier die abundante Milchbildung einleiten, liegt bestechend nahe, aber verschiedene Tatsachen lassen diesen Gedanken nicht aufkommen. In den Annales de Gynécologie 1901, T. LV, p. 307 findet sich die Angabe Lambrets, daß eine Frau, welcher am Ende der Gravidität der Uterus total exstirpiert worden war, ihr Kind ausgezeichnet nährte, und Pinard fand dasselbe häufig bei Frauen, an welchen die Porrosche Operation vollzogen war.

Persönlich hatte ich Gelegenheit, bei einer 37jährigen Patientin, an welcher bei beginnenden Geburtswehen wegen Portiocarcinom der vaginale Kaiserschnitt, mit nachfolgender Hysterectomie und Entfernung des einen (das corpus luteum verum tragenden) Ovariums gemacht worden war, 4 Tage später Milchsekretion zu konstatieren. Nach Lejoux††) dauert die Laktation kastrierter Kühe sogar länger, wie die nicht kastrierter, sodaß Einflüsse des Ovariums in der angedeuteten Richtung sicher auszuschließen sind.

*) Opitz, Über die Begriffe Milch und Colostrum. Centralbl. f. d. ges. Medicin 1884.

**) Minorow, De l'influence du système nerveux sur les glandes mammaires; Arch. de la Soc. Biol. de St. Petersburg 3, 353.

***) Pfister, Über die reflektorischen Beziehungen zwischen Mamma und Genitalien, Beitr. z. Geburtsh. u. Gynäkologie 1901, Heft 3/4.

†) Ribbert, Transplantation von Ovarium, Hoden, Mamma, Arch. f. Entwicklungsmech. 1898.

††) Chem. Centralbl. 1890, 586.

Man könnte weiter noch daran denken, daß vielleicht die Geburtswehen oder eine weiter zurückliegende Ursache des Geburtseintrittes auch die Funktion der Milchsekretion auslösten, zumal da letztere ja auch nach Frühgeburten in den ersten Monaten (de Sinéty) gefunden wurde.

Aber auch diese Erklärung muß zurückgewiesen werden; bei einer mit Myomen behafteten 26 jährigen Primigraviden wurde im 5. Monat der Uterus amputiert, und einige Tage später sezernierten die Brustdrüsen Milch.

So scheint mir nur eine Annahme übrig zu bleiben, in deren Rahmen sich die bisher bekannten Tatsachen fügen:

Es geht von dem wachsenden Ei während der Gravidität ein Einfluß aus auf die Milchdrüsen in der Richtung eines Wachstumsreizes, der zugleich die Zellen vor jenem autolytischen Zerfall schützt, der allem Anschein nach in sezernierenden Milchdrüsen in größerem Umfang vor sich geht.

Sobald mit der Entfernung des Eies dieser die Substanzeinschmelzung hemmende Faktor weggefallen ist, kann die in schwellender Kraft stehende Drüse reichlich Milch sezernieren; vielleicht vermag sie auch jetzt Substanzen des kreisenden Bluts an sich zu reißen und zu verarbeiten, auf welche vordem das sich entwickelnde Ei größere Anziehungskraft besaß.

Es würde die Gravidität danach also den Milchdrüsen gegenüber zwar ein die Grundlagen der Funktionsmöglichkeit stark erhöhendes, die Funktionsausübung aber hinderndes Moment darstellen.

Vielleicht läßt sich die während der ersten Tage beobachtete Verzögerung bei der Autolyse des Gemenges von Placenta und Mamma in ähnlichem Sinn deuten. Gut würde mit dieser Vorstellung auch in Einklang stehen, was Kehrer*) über Milchsekretion bei von neuem eingetretener Gravidität schreibt: „Es ist eine alte bei Frauen und milchenden Säugetieren genügend festgestellte Erfahrung, daß beim Eintritt einer neuen Schwangerschaft die bereits längere Zeit vorhandene Milchabsonderung noch eine gewisse Zeit fortdauert, dann merklich abnimmt und zuletzt vollkommen versiegt. Für melkende Haustiere liegen darüber viele Zahlenangaben betreffs der täglich abgemolkenen Menge vor."

*) Kehrer, Sänger-Herff, Enzyklopädie 2, 260 (1900).

XXXII.

Zur Kenntnis der melanotischen Pigmente.

Von Dr. phil. **Hans Wolff,**
Assistent a. d. I. med. Klinik in Berlin.

Aus der I. med. Klinik der Universität Berlin (Abteilung für Krebsforschung).
(Direktor: Geh.-Rat Prof. Dr. E. v. Leyden).

Trotz einer ziemlich umfangreichen Literatur über die sog. Melanine ist unsere Kenntnis dieser Verbindungen noch sehr gering. Die Tatsache indes geht mit Sicherheit aus den verschiedenen Arbeiten von Berdez und Nencki, Mörner, Schmiedeberg, Landolt und Sieber und vielen anderen Autoren hervor, daß eine ganze Reihe verschiedener Melanine existiert, die sich teils durch ihre Zusammensetzung, teils durch ihr physikalisches Verhalten von einander unterscheiden. Die meisten Forscher haben sich nun weniger mit den Melaninen selbst und ihrer Zusammensetzung bzw. Konstitution beschäftigt, als vielmehr mit der Frage nach ihrer Entstehung. Zuerst glaubte man in dem Vorhandensein von Eisen den Nachweis dafür gefunden zu haben, daß die Melanine Umwandlungsprodukte des Blutfarbstoffs sind. Indessen mußte man später zugeben, daß dieser Beweis hinfällig ist, da im Körper Eisen ja auch außerhalb des Blutes vorhanden ist und zur Bildung neuer Stoffe herangezogen werden kann*). Weiterhin betonte man die Möglichkeit der Bildung von Melaninen aus Eiweißabbauprodukten, da es gelang, aus einer ganzen Anzahl der letzteren melaninähnliche Pigmente darzustellen: Durch längeres Kochen von Eiweißkörpern mit Säuren z. B. entstehen Melanoïdine

---

*) Auch ein großer Prozentgehalt Eisen würde meiner Ansicht nach die Herkunft des Pigmentes aus dem Blutfarbstoff nicht beweisen, denn bei der Bildung des Melanins kann ja eine Anhäufung von Eisen stattfinden, auch wenn das eisenhaltige Material nur wenig Eisen enthält. Damit soll aber keineswegs die Berechtigung der anderen Ansicht geleugnet, sondern nur ihre derzeitige Nicht-Stichhaltigkeit betont werden.

genannte, dunkelgefärbte Produkte. Diese hat Samuely*) genauer untersucht und mit Hilfe der Ergebnisse anderer Autoren stellt er eine Reihe von Gruppen auf, die vornehmlich zur Bildung von Pigmenten geeignet sind, und zwar sind dies die skatol-, pyrrol-, pyridin- und tyrosinbildenden Gruppen. Ja aus dem Tyrosin selbst gelang es auf einem sehr interessanten Wege O. v. Fürth und Hugo Schneider**) mittelst eines Ferments aus Deiliphila-puppen einen schwarz gefärbten Körper darzustellen, der die wesentlichen Eigenschaften der natürlichen Melanine besaß.

Alle diese Arbeiten beweisen zwar, daß schwarze Pigmente aus Eiweißspaltungsprodukten entstehen können, aber in keiner ist der Beweis enthalten, daß diese künstlichen Melanine einen ähnlichen Ursprung haben, wie die natürlichen.

Auf einem anderen Wege versuchte Langhans***) dieser Frage näherzutreten. Er spritzte Tieren Blutfarbstoff unter die Haut und fand, daß zwar eine Pigmentbildung eintrat, diese aber in kurzer Zeit sistierte und daß das gebildete Pigment bald wieder verschwand. Ein interessantes Resultat, das aber zur Beantwortung des gestellten Problems absolut ungeeignet war.

Das Arbeiten über diese jedenfalls sehr komplizierten Stoffe wird nun durch zwei Umstände noch wesentlich erschwert: Erstens hat man meistens nur sehr geringe Mengen des Pigments in Händen und zweitens kommen oft verschiedene Pigmente nebeneinander vor und es gelingt nur in den seltensten Fällen, diese dann vollständig von einander zu trennen. Das Vorkommen mehrerer Pigmente speziell in den Melano-Sarkomen hat wohl zuerst Mörner beobachtet. Ihm gelang es nachzuweisen, daß im Harn der beobachteten Patienten je ein in Essigsäure lösliches und unlösliches Melanin sich vorfand. In dem Tumor fand er dann das lösliche Pigment wieder und daneben noch ein drittes, das essigsäureunlöslich war. Auch Zdarek und Zeynek†) und Brandl und Pfeiffer††) haben in Tumoren mehrere Melanine nebeneinander gefunden. Erstere haben allerdings die von ihnen dargestellten Präparate möglicherweise künstlich erzeugt, da sie das Pigment mindestens einen Tag lang mit Ammoniak behandelten. Bei Brandl und Pfeiffer dagegen ist der Unterschied in den Löslichkeiten der Melanine in Natronlauge zu augenfällig, als daß

*) Diese Beiträge **1**, 229.
) ibid. **2, 355.
***) Virchows Archiv **49**, 66.
†) Zeitschr. f. physiol. Chemie **36**, 493.
††) Zeitschr. f. Biologie **26**, 348.

er auf eine Veränderung durch das Lösungsmittel bezogen werden könnte. Aus ihren Analysenzahlen geht hervor, daß sie mindestens 2, möglicherweise auch 3 von einander verschiedene Pigmente isoliert haben.

Mir selbst ist es nun ebenfalls geglückt, in einer melanotischen Leber die Anwesenheit zweier wesentlich von einander verschiedener Pigmente zu konstatieren, obwohl es mir nicht gelang, beide in unverändertem Zustande darzustellen.

Zur Isolierung des Pigments wandte ich die auch früher (z. B. von Brandl und Pfeiffer) schon benutzte Verdauungsmethode an:

Die gut zerkleinerte Leber wurde mit Pepsinsalzsäurelösung im Brutschrank behandelt, nach dem Auswaschen mit neuer Pepsinlösung übergossen und diese Behandlung fortgesetzt, bis im Filtrat keine Albumosen mehr nachweisbar waren. Der Rückstand wurde nunmehr mit 8proz. Sodalösung behandelt und die dunkelbraun gefärbte Lösung filtriert. Das Ungelöstgebliebene wurde nun so lange mit Sodalösung extrahiert, bis das Filtrat farblos ablief. Aus den gesammelten Filtraten wurde das Melanin mit Essigsäure gefällt und durch wiederholtes Lösen und Ausfällen gereinigt. Schließlich wurde das Pigment mit Alkohol und Äther vielfach gewaschen und zuletzt bei 110° getrocknet. Bei der Extraktion dieses Pigmentes (das mit A bezeichnet werden soll) mittelst Sodalösung, blieb noch ein relativ bedeutender schwarz gefärbter Rückstand übrig. Da auch verdünnte (5proz.) Natronlauge in der Kälte nichts zu lösen imstande war, wurde der Rest mit etwa 50 ccm Natronlauge auf 50 bis 60° erwärmt. Nun löste sich zwar der größte Teil auf, unterlag indessen gleichzeitig einer chemischen Einwirkung. Als das Filtrat nun mit Essigsäure angesäuert wurde, blieb es klar. Erst beim Zufügen von Salzsäure fiel ein feinkörniger Niederschlag aus, der im Überschuß der Säure nur wenig löslich war, der sich aber in Sodalösung und kalter Lauge spielend löste. Daraus geht also hervor, daß das zweite sodaunlösliche Pigment (B) durch die Behandlung mit warmer Natronlauge verändert worden war.

Die Menge der beiden Pigmente war sehr gering; von A erhielt ich 0,8 g, von B nur 0,5 g.

Pigment A war ein braunschwarzes, mattes Pulver, es enthielt neben Schwefel auch noch Eisen und zwar in recht erheblicher Menge*):

1. 0,1509 g Substanz gaben bei der Verbrennung 0,2688 g CO_2 und 0,0812 g H_2O, die Asche wog 0,0048 g: diese wurde mit Na_2SO_4 geschmolzen und das Eisen darin jodometrisch mit $^1/_{20}$-Normallösungen bestimmt; verbraucht wurden 1,4 ccm.
2. 0,1210 g Substanz: 0,2165 g CO_2 und 0,0648 g H_2O; die Asche wog 0,0040 g. Sie wurde wie oben titriert; verbraucht: 1,2 ccm.

*) Die zur Analyse benutzten Substanzen wurden stets mit Schwefelkohlenstoff ausgelaugt, um eventuell beigemengten elementaren Schwefel zu entfernen, dann mit Alkohol und Äther gewaschen. Dies geschah in allen Fällen, deshalb erwähne ich es weiterhin nicht mehr besonders.

3. 0,1104 g Substanz wurden mit Soda-Salpeter verschmolzen: 0,0202 g $BaSO_4$; das Filtrat davon titriert: 1,1 ccm $^1/_{20}$-Normal-Thiosulfat.
4. 0,1808 g Substanz gaben 15,3 ccm N bei 20° und 763 mm.

Danach erhält das vorliegende Melanin:

nach Analyse	C	H	Fe	S	N	Asche
1.	48,57 Proz.	6,02 Proz.	2,33 Proz.			3,18 Proz.
2.	48,80 „	5,99 „	2,78 „			3,31 „
3.			2,79 „	2,51 Proz.		
4.					9,75 Proz.	
im Mittel	48,68 Proz.	6,00 Proz.	2,63 Proz.	2,51 Proz.	9,75 Proz.	3,24 Proz.

Der Rest der Substanz wurde benutzt, um etwas über die Bindungsart des Eisens zu erfahren. Einige Melanine nämlich enthalten das Eisen so fest gebunden, daß es sich durch Salzsäure nicht oder nur zum kleinen Teil herauslösen läßt, während andere schon durch Behandlung mit verdünnter Salzsäure eisenfrei werden. Letzterem Verhalten schließt sich das vorliegende Pigment an: 0,209 g wurden mit 20proz. Salzsäure $^1/_2$ Stunde zum Sieden erhitzt, die Lösung filtriert und das Eisen darin gewichtsanalytisch bestimmt; gefunden 0,0063 g Fe_2O_3 = 2,11 Proz. Fe; d. h. es werden 80 Proz. des vorhandenen Eisens durch Salzsäure dem Pigment entzogen.

Auch das durch Behandlung mit Natronlauge aus dem Pigment B entstandene Produkt wurde analysiert; es enthielt nur Spuren von Schwefel und kein Eisen. Ein Rückschluß hieraus auf die Zusammensetzung des ursprünglichen Farbstoffes wäre natürlich verfehlt.

0,1885 g Substanz gaben 0,3498 g CO_2 und 0,0998 g H_2O
0,1947 g gaben 17,2 ccm N bei 18° und 761 mm.

Die Zusammensetzung ist demnach in Prozenten:

C	H	N	S
50,59	5,92	10,24	Spuren

Größeres Interesse bietet ein anderes Melanin, das ich aus einer sehr großen, stark melanotischen*) Leber gewann. Da ich etwas über 35 g davon erhielt, konnte ich nicht nur die Einheitlichkeit des Präparates nachweisen, sondern es gelang mir auch, durch ein geeignetes Verfahren einige Spaltungs- bzw. Oxydationsprodukte zu erhalten, die durch ihre Eigentümlichkeit wohl der Beachtung wert sein dürften.

Die Darstellung des Pigments war analog der oben beschriebenen. Durch Sodalösung wurde hier indessen fast der ganze Verdauungs-

*) Metastasen eines primären Augentumors.

rückstand gelöst. Die Fällung mit Essigsäure wurde mit Alkohol und Äther gewaschen und ein kleiner Teil davon zur Analyse benutzt. Der Rest wurde zweimal der Lösung mit Soda und Fällung mit Essigsäure unterworfen und das so gereinigte Präparat wieder analysiert. Der Rest wurde noch fünfmal derselben Umfällung unterzogen und wieder analysiert. Die Übereinstimmung der letzten beiden Analysenreihen dürfte wohl ein ausreichender Beweis dafür sein, daß hier in der Tat ein einheitlicher Körper vorlag. Denn bei einem Gemisch müßte man erwarten, daß durch das fünfmalige Umfällen eine Änderung in der Zusammensetzung eingetreten wäre.

1. Vor dem Umfällen:

0,1914 g gaben 0,3817 g CO_2 und 0,1013 g H_2O
0,1818 „ „ 0,3614 „ „ „ 0,0918 „ „
0,1643 „ „ 16,3 ccm N (21°, 764 mm)
0,1959 „ „ 18,7 „ „ (18°, 766 mm)
0,1808 „ „ 0,0204 g $BaSO_4$.

	C	H	N	S
	54,39	5,92	11,40	1,55
	54,21	5,65	11,14	—
im Durchschnitt	54,30	5,79	11,27	1,55

2. Nach zweimaligem Umfällen:

0,2113 g gaben 0,4430 g CO_2 und 0,1016 g H_2O
0,1874 „ „ 0,3933 „ „ „ 0,0928 „ „
0,1730 „ „ 14,1 ccm N (18°, 766 mm)
0,1768 „ „ 13,9 „ „ (17°, 766 „)
0,2114 „ „ 0,0248 g $BaSO_4$.

	C	H	N	S
	57,18	5,38	9,53	1,61
	57,23	5,59	9,24	—
im Durchschnitt	57,20	5,48	9,38	1,61

3. Nach siebenmaligem Umfällen:

0,2403 g gaben 0,5056 g CO_2 und 0,1173 g H_2O
0,2099 „ „ 0,4412 „ „ „ 0,0977 „ „ und 0,0250 g $BaSO_4$*)
0,2968 „ „ 23,7 ccm N (21°, 764 mm)
0,2008 „ „ 16,2 „ „ (15°, 752 „)
0,3469 „ „ 0,0445 g $BaSO_4$.

	C	H	N	S
	57,38	5,46	9,13	1,64
	57,32	5,21	9,46	1,76
im Durchschnitt	57,36	5,34	9,29	1,70

Mit Berücksichtigung der Analysen 2 und 3 hat demnach das Pigment folgende Zusammensetzung:

Proz. C	Proz. H	Proz. N	Proz. S	Proz. O
57,28	5,41	9,34	1,67	26,30

*) Diese Analyse wurde nach der Methode von **Dennstedt** mittelst platinierten Quarzes ausgeführt.

Von den Analysen blieben mir noch etwa 32 g Pigment übrig. Zunächst gedachte ich das gesamte Pigment der Oxydation mit Chromsäure bzw. Kaliumbichromat und Schwefelsäure zu unterwerfen. Gelang es doch Spiegler mittelst dieses Oxydationsmittels aus dem Haarpigment einen wohl definierten chemisch einfachen Körper darzustellen, nämlich eine Methyldibutylessigsäure, ein Resultat, das auf die Konstitution der Pigmente ein ganz eigenartiges Licht wirft.

Bei einem Vorversuch zeigte sich indessen, daß bei dem vorliegenden Melanin diese Oxydation ganz anders verläuft und zur Gewinnung einfacher Abbauprodukte völlig ungeeignet ist. Es wurden 2 g Substanz mit einer Lösung von 8 g Kaliumbichromat und 10 g konzentrierter Schwefelsäure in 25 ccm Wasser erwärmt. Nach 1/4 Stunde war alles bis auf Spuren gelöst. Nunmehr wurde mit etwa 200 g Wasser verdünnt. Dabei fiel ein schiefergrauer pulvriger Niederschlag aus. Die filtrierte Lösung ließ bei Extraktionsversuchen mit Äther, Chloroform und Benzol nichts in diese Medien übergehen. Der Filterrückstand zeigte sich allein löslich in konzentrierten Säuren; aus den — übrigens braun gefärbten — Lösungen fiel er beim Verdünnen unverändert wieder aus. Auch Erwärmen mit konzentrierten Säuren, bis auf konzentrierte Schwefelsäure, ließ den Körper unverändert. Mit letzterer erhitzt spaltete er reichlich Kohlensäure ab und färbte die Säure tief dunkel, fiel also offenbar völliger Zersetzung anheim: Die Menge des zweimal aus Säuren mit Wasser gefällten Pulvers betrug 1,2 g, etwa 1/3 davon wurde zu den eben beschriebenen Versuchen verbraucht, der Rest zu den folgenden Analysen.

0,1982 g gaben 0,0816 g H_2O, 0,3036 g CO_2 und 0,0096 g Cr_2O_3
0,2463 „ „ 21,0 ccm N bei 19° und 761,5 mm
0,2444 „ „ bei der Salpeterschmelze 0,0466 g $BaSO_4$ und 0,0121 g Cr_2O_3.

Die Substanz enthält demnach:

C	H	N	S	Cr
41,77 Proz.	4,60 Proz.	9,85 Proz.	2,62 Proz.	I. 3,36 Proz.
				II. 3,39 „

Der relativ große Chromgehalt schien mir darauf hinzudeuten, daß er nicht als „Verunreinigung" zu deuten sei, sondern einen Bestandteil des Moleküls bilde. Um dies zu entscheiden, wurde der Oxydationsversuch in genau derselben Weise wiederholt: die Reinigung durch Fällen aus der konzentrierten Säurelösung mit Wasser wurde indessen diesmal öfter vorgenommen. Die Ausbeute betrug schließlich (aus 1 g Ausgangsmaterial) 0,432 g. Die ganze Menge wurde mit Sodasalpeter geschmolzen, die Schmelze nach dem Lösen auf 250 ccm aufgefüllt und in je 100 ccm H_2SO_4

und Cr titrimetrisch bestimmt: Gefunden 0,0340 g $BaSO_4$ und 3,8 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung, d. h. 2,70 Proz. S und 3,82 Proz. Cr.

Die Übereinstimmung mit den früher gefundenen Zahlen kann wohl als Beweis dafür gelten, daß das Chrom dem Molekül angehört. In welcher Weise die Bindung erfolgt ist, ist wohl kaum zu entscheiden.

Nunmehr prüfte ich das Verhalten des Melanins gegen andere Agentien, um — wenn möglich — einen Vergleich anstellen zu können mit dem von Landolt genauer untersuchten Rinderaugenpigment. Indessen verliefen die Reaktionen bei dem vorliegenden Pigment wesentlich anders.

Als 3 g Substanz der Kalischmelze unterworfen wurden, machte sich ein Skatolgeruch — wie beim Augenpigment und manchen anderen „Melaninen" — nicht bemerkbar. Als jedoch die Schmelze angesäuert wurde, entstand ein intensiver Blausäuregeruch. Gleichzeitig fiel das übrigens schwefelfreie Reaktionsprodukt in Form mäßig dunkler, brauner Flocken aus. Sie wurden durch mehrfaches Lösen in verdünnter Lauge und Fällen mit Salzsäure gereinigt. Die Analysen ergaben zwar ähnliche Zahlen wie Landolt sie beim Rinderaugenpigment fand, doch wird bei dem abweichenden Verhalten während des Schmelzens ein Vergleich kaum zu ziehen sein.

0,1868 g gaben 0,4131 g Kohlensäure und 0,0680 g Wasser.

Demnach ist die Zusammensetzung:		Landolts Präparat:	
C	60,31 Proz.	C	60,05 Proz.
H	4,07 „	H	3,65 „
N	11,11 „	N	10,70 „

Beim Behandeln des Augenpigments mit Salpetersäure kam Landolt zu einem dunkel gefärbten, der Beschreibung nach kristallinischen Körper, von dem er Analysen leider nicht mitgeteilt hat. Mein Melanin gab bei der gleichen Behandlung einen Körper, der sich dem Aussehen nach nicht vom Ausgangsmaterial unterschied. Den höheren Stickstoffgehalt glaubte ich zunächst durch stattgefundene Nitrierung erklären zu können, wie dies Landolt bei seinem Produkt ebenfalls annimmt. Doch wird dies sehr unsicher durch den Oxydationsversuch mit Natriumperoxyd, bei dem ein ebenfalls sehr stickstoffreiches Produkt erhalten wurde. Man kann wohl daraus den Schluß ziehen, daß bei der Oxydation zunächst stickstoffarme oder -freie Gruppen der Zerstörung anheimfallen, so daß das Oxydationsprodukt stickstoffreicher erscheint und im Falle der Salpetersäureoxydation eine Nitrierung vorgetäuscht werden kann.

Die Behandlung des Melanins mit Salpetersäure wurde in der von Landolt (loc. cit.) beschriebenen Weise ausgeführt: 2 g Pigment wurden mit einer Mischung von konzentrierter Schwefelsäure und Salpetersäure erwärmt. Dabei blähte sich das Melanin auf. Nach dem Verdünnen mit Wasser wurde filtriert. Durch Lösen in 1proz. Natronlauge und Fällen mit Essigsäure wurde das Reaktionsprodukt gereinigt.

Behufs Oxydation mit Natriumsuperoxyd wurde zu 20 ccm einer halbkonzentrierten Lösung von NaO allmählich 1 g Melanin (in Sodalösung) gegeben. Nach etwa 1stündigem Stehen wurde angesäuert und das ausgefallene braune Pulver abfiltriert und wie üblich gereinigt. Ausbeute etwa 0,6 g.

Analyse des mit HNO_3 behandelten Produkts:

(Die Substanz enthielt auch Schwefel, doch reichte die Menge nicht zu einer S-Bestimmung, da die Ausbeute sehr gering war.)

0,1651 g gaben 0,2811 g CO_2 und 0,0508 g Wasser; 0,1758 g Substanz gaben 18,6 ccm N bei 764 mm, 21°.

C Proz.	H Proz.	N Proz.	S Proz.
46,44	3,44	12,17	?

Analyse des mit NaO behandelten Produktes:

0,1713 g gaben 0,2939 CO_2 und 0,0591 H_2O; 0,1629 g lieferten 16,3 ccm N bei 762 mm, 20°; 0,1774 g gaben 0,0122 g $BaSO_4$.

C Proz.	H Proz.	N Proz.	S Proz.
43,50	3,86	11,52	0,95

Da alle diese Oxydationsmittel das Pigment teils völlig verbrannten, teils in andere mindestens ebenso komplizierte Substanzen verwandelten, also zur Darstellung einfacher, chemisch definierter Körper ungeeignet waren, schlug ich zur Erreichung dieses Ziels einen anderen Weg ein. Die Behandlung der verschiedenen Melanine mit Salzsäure ist von vielen Forschern ausgeführt worden, ohne daß dabei eine wesentliche Veränderung der Pigmente stattgefunden hätte. Andererseits ist auch die Einwirkung von Brom auf diese Farbstoffe des öfteren geprüft worden, meistens mit dem Erfolg, daß dabei eine Bromierung nicht stattfand, sondern anderweitige Reaktionen eintraten. In der — nicht ohne weiteres richtigen — Ansicht, daß diese Reaktionen oxydative Prozesse waren und in der Hoffnung, daß bei gleichzeitiger Anwendung von starker Säure und Brom die beiderseitig zu erwartende Wirkung: Hydrolyse und Oxydation zum Abbau geeigneter wäre als jedes einzelne Mittel für sich, unterwarf ich mein Pigment folgender Prozedur:

2 g Pigment wurden mit 10 ccm rauchender Bromwasserstoffsäure und 1/2 g Brom im Einschlußrohr 2 Stunden lang auf 120° erhitzt. Nach dem Erkalten und Öffnen des Rohrs zeigte sich die ziemlich dunkel ge-

färbte Flüssigkeit von Öltröpfchen durchsetzt. Nach dem Verdünnen mit Wasser, wobei sich nur wenig einer harzigen Substanz abschied, wurde die Reaktionsflüssigkeit mit Äther geschüttelt. Beim Verdunsten des letzteren blieb ein dicker eigentümlich riechender Öltropfen zurück.

Es wurden nunmehr noch 8 Portionen des Pigments in der eben beschriebenen Weise behandelt. Die gesammelten und mit Wasser verdünnten Lösungen wurden dann mit Äther extrahiert; der Äther wurde verdunstet. in das Kölbchen Wasser (50 ccm) gefüllt und schließlich mit Wasserdampf destilliert. Die Hauptmenge des Öls ging dabei über — im Kölbchen schied sich etwas Harz während der Destillation ab — und wurde aus dem Destillat mit Äther isoliert. Das ätherische Extrakt wurde mit Chlorcalcium getrocknet und dann der Äther abdestilliert, das zurückbleibende Öl ging bei der Destillation bei 208 bis 212° (korr.) über. Es war eine dünnflüssige zitronengelbe Flüssigkeit mit intensivem eigentümlichem Geruch. Sie enthielt weder Halogen, Schwefel noch Stickstoff. Die Menge war etwa 2,8 g.

In einer mit Quecksilber ausgewogenen Kapillare wurde das spezifische Gewicht bestimmt.

0,385 ccm Öl wogen 0,3460 g; 0,401 ccm 0,3565 g. daraus ergibt sich als spezifisches Gewicht 0,894 bzw. 0,890, im Durchschnitt 0,892.

Die Analysen gaben folgendes Resultat:

I. 0,1710 g Substanz gaben 0,5042 g CO_2 und 0,1617 g H_2O
II. 0,1825 „ „ „ 0,5377 „ „ „ 0,1744 „ „

	I.	II.
C	80,40	80,33
H	10,58	10,69

Aus diesen Analysen berechnet sich folgende Formel:

$C_{12}H_{20}O$ oder allenfalls $C_{12}H_{13}O$.

Von Substanzen, auf die diese Formel stimmen könnte, findet sich in Richters Kohlenstofflexikon nur $C_{12}H_{18}O$ angegeben und zwar für ein eigentümliches Kondensationsprodukt des Acetons: das Xyliton. Nun differiert aber der Siedepunkt des Xylitons (251 bis 252) um 40° von dem meines Öls; außerdem soll das Xyliton leicht verharzen, wenn es mit Säuren behandelt wird. Ein in dieser Richtung unternommener Versuch mit 0,5 g zeigte indessen, daß auch bei 24stündigem Stehen mit Säuren bei 50° das Öl garnicht angegriffen wird, da mit Äther 0,44 g wieder extrahierbar waren und Verharzung überhaupt nicht eintrat. Der Geruch des Öls, der für das Xyliton als „geraniumartig“ angegeben wird, könnte allerdings in dieser Weise bezeichnet werden.

Um das Verhalten gegen Brom zu prüfen — das Xyliton nimmt schon in der Kälte leicht Brom auf und spaltet dann Bromwasserstoff ab — versetzte ich den Rest der Substanz mit der genau 1 Molekül entsprechenden Menge titrierten Bromwassers, das in der Kälte nicht aufgenommen wurde. Die Flüssigkeit (Öl + Bromwasser) wurde deshalb in ein Rohr eingeschmolzen und zunächst im Wasserbade, dann, als auch bei 100° das Brom

nicht verschwand, im Ölbade weiter erhitzt. Erst als die Temperatur auf 150° stieg, verschwand das Brom innerhalb weniger Minuten. Nach dem Öffnen zeigte sich, daß ein Teil des Öls verharzt war und das Brom zu Bromwasserstoff reduziert war. Die stark verdünnte Flüssigkeit wurde nunmehr mit Wasserdampf destilliert. Dabei ging ein gelbes Öl über, das einen dem Ausgangsprodukt ähnlichen, aber weit intensiveren Geruch hatte. Es wurde mit Äther aufgenommen, getrocknet und nach Verdunsten des Äthers aus einem Miniaturkölbchen destilliert: Ausbeute 0,8 g, Siedepunkt 245 bis 249°. Mit Säuren trat sehr bald Verharzung ein. Verdünnte Kaliumpermanganatlösung wurde in der Kälte sofort entfärbt:

Bei der Analyse gaben 0,2156 g: 0,6374 g CO_2 und 0,1991 g H_2O.

C Proz. 80,63 für Xyliton berechnet: C Proz. 80,82
H „ 10,33 „ „ „ H „ 10,20

Es ist wohl kein Zweifel, daß dies Produkt wirklich Xyliton ist. Ob es indessen durch Oxydation aus dem ursprünglichen Öl entstanden ist, wofür die hohen Wasserstoffzahlen des letzteren sprechen, oder ob eine Umlagerung durch die Gegenwart des Broms bei der hohen Temperatur bzw. beides stattgefunden hat, ist nicht zu entscheiden*); ebensowenig, ob das ursprüngliche Öl ein direktes Spaltungsprodukt des Melanins ist oder sekundär aus einem solchen entstanden ist. In der Annahme, daß das ursprüngliche Öl nicht allzu abweichend vom Xyliton gebaut ist, füge ich die Formeln für diesen Körper hinzu, wie sie von **Kerp** und **Müller** als die allein möglichen angegeben werden.

```
      I                        IIa                            IIb
     CH3                       CH3                            CH3
     |                         |                              |
     C                         C                              C
    / \                       / \                            / \
  HC   CH2                 H2C   CH            (CH3)2C = C     CH
  |    |   CH3              |    |                       |     |
  OC   C <                  OC   C(CH3)2                 OC    C(CH3)2
    \ /    CH3                \ /                          \  /
     C                         C = C(CH3)2                  CH2
     ||
     C(CH3)2
```

(Dabei gelten für das von den genannten Autoren aus Aceton dargestellte Xyliton nur die Formeln IIa oder IIb.)

Vergleicht man diese Formeln mit der von **Spiegler** aus dem Haarpigment gewonnenen Säure oder dem Kohlenwasserstoff, aus dem diese Säure wahrscheinlich bei der Oxydation entstanden

*) Das Auftreten von HBr nach der Behandlung mit Brom könnte im Falle der Umlagerung durch eine teilweise Oxydation leicht erklärt werden.

ist (loc. cit. S. 56), einem Isotributylen $\begin{matrix}(CH_3)_3 - C\\ (CH_3)_3 - C\end{matrix}\!\!>\!C = C(CH_3)_2$, so kann zwar von einem direkten Zusammenhang keine Rede sein; immerhin besteht eine wenngleich vielleicht nur äußerliche Ähnlichkeit. Die beiden Substanzen sind mit Methylgruppen förmlich überladen. Außerdem ist dem Xyliton und dem Isotributylen eine Gruppe: $\begin{matrix}\cdot C\\ \cdot C\end{matrix}\!\!>\!C = C\!<\!\begin{matrix}CH_3\\ CH_3\end{matrix}$ gemeinsam. Ob diese Ähnlichkeiten zufällige sind oder wirklich auf Beziehungen zwischen den beiden Melaninen hinweisen, wird erst entschieden werden können, wenn auch aus anderen Melaninen derartige Abbauprodukte dargestellt worden sind.

Bei der Wasserdampfdestillation des ursprünglichen Öls war nicht alles übergegangen. Der im Kolben verbliebene Rest wurde deshalb durch ein weitporiges Filter filtriert (zur Befreiung von dem ausgeschiedenen Harz) und mit Äther extrahiert. Der getrocknete ätherische Auszug hinterließ etwa 1 ccm eines Öls, das beim Destillieren etwa 0,4 g eines nur wenig gefärbten Öls lieferte. Dasselbe erwies sich als stickstoffhaltig, es war bei 127 bis 132° übergegangen. Die Analysen ergaben folgendes Resultat:

I. 0,1808 g gaben 0,4780 g CO_2 und 0,1784 g H_2O; II. 0,1218 g gaben 0,3216 g CO_2 und 0,1198 g H_2O; III. 0,1578 g gaben 23,5 ccm N bei 21° und 763,5 mm.

Aus den daraus berechneten Prozenten:

	C	H	C
I	72,09	11,04	—
II	72,01	10,98	—
III	—	—	17,11

ergibt sich die Formel C_5H_9N, für die sich C = 72,29, H = 10,84, N = 16,87 berechnet. Die Substanz ist Isovaleronitril, wie sich aus dem Siedepunkt, 127 bis 132° statt 129°, ergibt.

Auch bei diesem Körper könnte man im Zweifel sein, ob er nicht ein sekundäres Produkt ist; um so mehr, als bekanntlich diese Substanz aus Leucin durch starke Säuren gebildet wird. Indessen spricht ein Umstand dafür, daß das Nitril als solches im Melanin vorgebildet war: die Entstehung von Blausäure bei der Kalischmelze. Um dies wenn möglich sicher zu stellen, kochte ich 0,5 g Melanin mit etwas Kalilauge etwa $^1/_4$ Stunde lang. Beim Ansäuern war ein deutlicher Blausäuregeruch wahrnehmbar. Da bei letzterem Versuch sicher nicht eine etwa vorhandene Amidogruppe zur Cyangruppe werden konnte, so ist damit erwiesen, daß das Isovaleronitril im Melanin präformiert war; es sei denn, daß man die Annahme macht, daß noch ein anderer Bestandteil

des Melanins existiert, der Stickstoff in Form einer Cyangruppe enthält, wozu kein Anlaß vorliegt.

Bei der Extraktion der soeben beschriebenen Melaninbestandteile aus dem Reaktionsprodukt war eine dunkel gefärbte, durch Bromwasserstoff stark saure, wässerige Flüssigkeit übrig geblieben, aus der ein weiterer Körper in folgender Art gewonnen wurde.

Die Halogensäure wurde in der üblichen Weise mit Bleikarbonat entfernt und das Filtrat nach Behandlung mit Schwefelwasserstoff zur Entfernung des gelösten Bleis eingedampft. Der restierende Syrup zeigte sehr lange keine Änderung. Erst nach 6wöchentlichem Stehen im Eisschrank begann eine spärliche Kristallisation. Nach nochmaligem 2wöchentlichen Stehen wurde der Syrup auf Ton gestrichen, da auf andere Weise eine Isolation der Kristalle nicht zu erzielen war. Die Kristalle wurden zweimal umkristallisiert, zuerst unter Anwendung von Knochenkohle. Da sich noch anorganische Bestandteile nachweisen ließen, wurden die Kristalle in Alkohol gelöst, filtriert und durch Abdunsten des Alkohols wieder ausgeschieden. Die so erhaltene Substanz war zerfließlich und enthielt organisch gebundenes Brom, weder Stickstoff noch Schwefel.

Der Schmelzpunkt lag bei 61°; die erhaltenen Analysenzahlen würden auf eine Dibrompropionsäure hinweisen, doch kann, trotz des übereinstimmenden Schmelzpunkts die Substanz nicht Dibrompropionsäure sein, da letztere in Äther leicht löslich ist, der vorliegende Körper dagegen bei der Ätherextraktion (s. o.) in der wässerigen Lösung verblieb.

Analyse der Kristalle:

0,1808 g gaben 0,1055 g CO_2 und 0,0312 g H_2O
0,1603 „ „ 0,2567 „ AgBr.

C	Proz.	15,91
H	„	1,93
Br	„	68,14

(Für $C_3H_4Br_2O_2$ würde sich C = 15,52, H = 1,72 und Br = 68,96 Proz. berechnen.)

Zum Schluß möchte ich noch einmal kurz die Resultate dieser Arbeit wiederholen:

Es wurde in einer melanotischen Leber die Anwesenheit zweier Pigmente, eines sodalöslichen und eines sodaunlöslichen, festgestellt, von denen das letztere durch Natronlauge leicht angegriffen und in ein sodalösliches Produkt verwandelt wird.

Das lösliche Pigment gab niedrigere Kohlenstoffzahlen als die meisten Melanine.

Ferner wurde ein Melanin untersucht, dessen Einheitlichkeit durch eine Reihe Analysen vor und nach dem Umfällen sichergestellt wurde. Es wurde gefunden, daß dasselbe zu mindestens 15 Proz. aus einem hydroaromatischen Körper besteht, dessen Verwandt-

schaft mit dem sog. Xyliton bewiesen wurde*). Als ein weiterer Bestandteil des vorliegenden Melanins wurde das Isovaleronitril erkannt, das mindestens 2,5 Proz. des Moleküls darstellt**). Ein weiterhin isoliertes Produkt konnte nicht identifiziert werden. Auch wurde keine schwefelhaltige Substanz bei der oxydativen Spaltung gefunden, so daß über die Bindung des Schwefels garnichts ausgesagt werden kann.

---

*) Eine Spekulation, wie derselbe und aus welchen Gruppen derselbe entstanden sein könnte, scheint mir noch verfrüht zu sein. Bei dem Isovaleronitril kann man wohl als selbstverständlich annehmen, daß es durch irgend einen Prozeß aus Leucin hervorgegangen ist.

**) Wahrscheinlich ist bei der Wasserdampfdestillation ein Teil des Nitrils verseift worden; durch einen Unfall ging die restierende Lösung verloren, so daß ich das Vorhandensein der bei der Verseifung entstandenen Isovaleriansäure nicht beweisen kann.

XXXIII.

Über den Schwefelgehalt der Verdauungsprodukte des Kaseins.

Von **W. v. Moraczewski** (Karlsbad).

Aus dem Laborat. f. med. Chemie (Prof. Dr. W. Niemilowicz in Lemberg).

Vor etwa zehn Jahren habe ich in betreff des Phosphorgehalts der Verdauungsprodukte des Kaseins festgestellt*), daß der Phosphor des Kaseins bei der Verdauung zum größten Teil in Lösung geht und nur ein unbedeutender Rest mit dem Paranuclein zurück bleibt. Dieser Rest kann je nach den Bedingungen, unter welchen sich die Verdauung vollzieht, mit einer größeren oder geringeren Eiweißmenge verbunden sein. Wird das Kasein in viel Salzsäure aufgelöst und dauert die Verdauung lang, etwa 4 bis 6 Wochen, so bleibt sehr wenig Paranuclein zurück und dieses enthält viel Phosphor (4 bis 6 Proz.). Unterbricht man die Verdauung nach 24 Stunden und — was besonders von Einfluß — ist die Kaseinlösung möglichst konzentriert, so erhält man viel aber verhältnismäßig phosphorarmes Paranuclein (mit 0,5 bis 1 Proz. P).

Danach ist anzunehmen, daß im Kasein ein phosphorreicher Kern enthalten ist, der im ersten Fall fast vollständig aus der Verbindung mit Eiweiß losgelöst wird, minder vollständig im zweiten Fall.

Ich habe, der Anregung von Prof. Niemilowicz folgend, ähnliche Versuche über das Verhalten des Schwefels während der Verdauung angestellt.

Die Versuchsanordnung ging dahin, reines Kasein in Vergleichsversuchen

1. ungleich lange Zeit,
2. bei ungleich hohem Pepsin- und Salzsäuregehalt,
3. bei ungleicher Verdünnung der Kaseinlösung

---

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie **20**, 28.

der Verdauung zu unterwerfen und festzustellen, ob die Verdauungsprodukte im Vergleich zum Kasein eine Änderung des Schwefelgehalts aufweisen.

Zu diesem Zwecke wurde bestimmt 1. der Schwefel- und Stickstoffgehalt der mit Pepsin versetzten Kaseinlösung (Ausgangslösung), 2. der Schwefel- und Stickstoffgehalt der vom gebildeten Paranuclein abfiltrierten Verdauungsflüssigkeit (Kaseosenlösung), 3. der Schwefelgehalt des Paranucleins.

Die nähere Ausführung gestaltete sich folgendermaßen: Die Verdauungsversuche wurden in Kölbchen vorgenommen.

Zur Stickstoffbestimmung der Ausgangslösung diente meist ein Zehntel der Ausgangslösung (25 bis 100 ccm). Zur Schwefelbestimmung ein Viertel oder Fünftel (50 bis 200 ccm). Immer wurden doppelte oder dreifache Bestimmungen ausgeführt und nur gut übereinstimmende Resultate berücksichtigt. Das Gewicht der Ausgangslösung wurde genau bestimmt, beim Abbruch des Versuches wurde das verdampfte Wasser sorgfältig wieder ersetzt.

Dann wurde das Paranuclein auf gewogene aschefreie Filter gebracht und mit verdünnter Salzsäure von der beim Versuch angewandten Konzentration ausgewaschen, bis die Waschflüssigkeit keine Biuretreaktion mehr aufwies. Um das Auswaschen in allen Versuchen möglichst gleichmäßig zu gestalten, wurde es abgebrochen, wenn die Menge der Waschflüssigkeit 200 ccm betrug.

Das Abfiltrieren der Kaseosenlösung erfolgte möglichst rasch. Von dem Filtrate wurde der zehnte Teil für die Stickstoffbestimmung, die Hälfte für die Schwefelbestimmung benutzt.

Die Schwefelbestimmungen wurden nach Liebig ausgeführt. Der Schwefelgehalt der aschefreien Filter, der sich übrigens als sehr gering ergab — 0,0001 bis 0,00005 g $BaSO_4$ pro Filter — wurde in Abzug gebracht. Da uns der Säuregehalt beim Ausfällen mit Chlorbaryum von ausschlaggebender Bedeutung erschien, haben wir mit dem Salzsäurezusatz aufgehört, sobald die erste Reaktion auf Lackmus von einer bestimmten Nuance erreicht war. Nach 24stündigem Stehen wurde abfiltriert, der Niederschlag fünfmal mit säurefreiem Wasser ausgekocht. Nach dem Veraschen im Platintiegel wurde das eventuell gebildete Schwefelbaryum mit 1 Tropfen Salpetersäure oxydiert.

Trotz gleichmäßiger Anstellung der Versuche wurden in Parallelproben, namentlich in Bezug auf das Paranuclein, öfter ziemlich abweichende Zahlen erhalten. Es mag dies an der launenhaften verschieden lang dauernden Filtration liegen. In den Versuchen mit großen Kaseinmengen und kurzer Verdauungszeit war der Einfluß der Filtrationsdauer besonders merklich. Es gelang nicht diese Fehlerquelle zu vermeiden; doch ist sie auf das Gesamtergebnis ohne Einfluß.

I. Versuchsreihe.

6 Maaßkolben à 100 ccm werden mit je 95 ccm einer salzsauren Kaseinlösung und 5 ccm einer 10proz. Pepsinlösung beschickt.

Gesamtstickstoff 0,294 g als Mittel aus 0,280 g / 0,308 „

Gesamtschwefel 0,00634 „ „ „ „ 0,00608 g / 0,00660 „

Nach 5 Tagen: a) 0,3705 g Paranuclein gaben 0,00133 g S
Filtrat = 0,00590 „ S

Filtrat = 0,147 g N Mittel aus 0,154 g / 0,140 „

b) 0,4819 g Paranuclein gaben 0,00272 g S
Filtrat = 0,00582 „ S
Filtrat = 0,140 „ N

Nach 10 Tagen: c) 0,2997 g Paranuclein gaben 0,00120 „ S
Filtrat = 0,00676 „ S
Filtrat = 0,252 „ N

d) 0,3248 g Paranuclein gaben 0,00123 „ S
Filtrat = 0,00804 „ S
Filtrat = 0,242 „ N

Nach 40 Tagen: e) 0,3044 g Paranuclein gaben 0,00127 „ S
Filtrat = 0,00586 „ S
Filtrat = 0,256 „ N

f) 0,3443 g Paranuclein gaben 0,00166 „ S
Filtrat = 0,245 „ N

Man sieht, daß der Gehalt an Schwefel im Filtrate, also in der Kaseosenlösung, fast ohne Änderung bleibt, sogar im Abnehmen zu sein scheint, während der Stickstoff zunimmt, so daß das Verhältnis N : S stetig wächst.

Kaseosen nach 5 Tagen N : S = 26
„ 10 „ N : S = 37
„ 40 „ N : S = 47.

Das Gewicht des unverdauten Paranucleins unterliegt ebenfalls geringen Schwankungen und ein Gehalt an Schwefel — 0,36 Proz. (nach 5 Tagen), 0,39 bis 0,40 Proz. (nach 10 Tagen) und 0,41 bis 0,48 Proz. nach 40 Tagen — zeigt eine gewisse Neigung zum Wachsen. —

Die Kaseinlösung war ziemlich konzentriert, trotzdem war nach 5 Tagen fast alles Kasein verdaut und die weitere Verdauung brachte so gut wie keine Veränderung mehr hervor.

II. Versuchsreihe.

Sämtliche Proben wurden monatelang der Verdauung überlassen, wobei verschiedene Mengen Pepsin zugesetzt wurden. Es sollte hauptsächlich die Menge des Paranucleins, sein Schwefelgehalt sowie das Verhältnis N : S bestimmt werden. —

a) 350 ccm einer verdünnten, mit Pepsin versetzten Kaseinlösung wurden durch Verdampfung auf 220 ccm reduziert.

N = 0,084 Proz. Gesamt-N 0,1848 g
„ -S 0,005258 g

1. Probe: 0,1592 g Paranuclein 0,00085 g S
   Filtrat 0,00466 „ S
2. Probe: 0,1559 g Paranuclein 0,00097 g S
   Der Prozentgehalt an Schwefel, 0,53 bis 0,62 Proz., ist also etwas höher als der des ursprünglichen Kaseins.

b) 160 ccm Kaseinlösung, wenig Pepsin enthaltend.
   Paranuclein 0,045 g = 0,0002 g S
   Filtrat 0,008112 „ S, 0,2672 „ N
   N : S = 32.
   Das Paranuclein war fast vollständig verdaut. In den Kaseosen war das Verhältnis N : S etwa wie bei mittlerer Verdauung.

c) 400 ccm (verdünnter) Kaseinlösung, viel Pepsin enthaltend.
   Paranuclein unwägbar
   Filtrat 0,001787 g S = 0,00714 g
   0,04235 Proz. N = 0,1694 g
   N : S = 23.

d) 640 ccm verdünnte Kaseinlösung, wenig Salzsäure.
   Paranuclein 0,0034 g = 0,0002 g S
   Filtrat 0,063 Proz. N = 0,4232 „ „
   0,001985 Proz. S = 0,0127 „ „
   N : S = 33.

III. Versuchsreihe.

Diese Versuchsreihe wurde mit einem Kasein ausgeführt, welches, vermutlich infolge mehrmaligen Umfällens aus Ammoniaklösung, etwas schwefelärmer war. Die Versuchsanordnung war die übliche.

95 ccm Kaseinlösung, 5 ccm 2proz. Pepsinlösung.
   Gesamt-N = 0,364 g, „ = 0,368 „ } Mittel 0,366 g
   Gesamt-S = 0,0050 $BaSO_4$, „ = 0,0054 „ = 0,002884 g S
   N : S = 127.

a) Nach 20 Stunden:
   Paranuclein 0,4285 g = 0,00044 g S (ber.)
   0,051 g N
   Filtrat 0,00244 g S (berechnet aus 0,0092 $BaSO_4$, „ „ 0,0085 „)
   0,315 g N (berechnet aus 0,308 g, „ „ 0,382 „)
   N : S = 129.

b) Nach 70 Stunden:
   Paranuclein = 0,2749 g enthaltend 0,00078 g S (ber.) und 0,033 g N
   Filtrat 0,00210 g S (Mittel berechnet aus 0,0075 $BaSO_4$, „ „ „ 0,0078 „)
   0,3325 g N (Mittel berechnet aus 0,336 N, „ „ „ 0,329 „)
   N : S = 158.

c) Nach 160 Stunden:
Paranuclein 0,2460 g = 0,00112 g S (ber.)
Filtrat 0,012 g N
0,00176 g S
0,354 g N (Mittel berechnet aus 0,351 und 0,357 N)
N : S = 201.

Aus dieser Versuchsreihe, in welcher der Schwefel des Paranucleins aus der Differenz des Gesamtschwefels und des im Filtrat gefundenen berechnet wurde, ergibt sich anscheinend, daß das Paranuclein stetig auf Kosten des Filtratschwefels an Schwefel reicher wird. Tatsächlich ist dies aber nicht der Fall, wie andere Paranucleinanalysen beweisen, sondern der Schwefel erleidet während der Verdauung eine stetige Abnahme. — Das Verhältnis des N : S im Filtrat wird immer größer, was das oben Gesagte illustriert.

IV. Versuchsreihe.

Hier wurde zur Verdauung das reinste Präparat (Caseinum purissimum Hammarsten von E. Merck) verwendet. Darin wurde der Schwefel- und Stickstoffgehalt mehrfach bestimmt, ebenso in dem zugesetzten Pepsin.

Für jede Verdauung wurden 4 g trockenes Kasein abgewogen und in 150 ccm einer 5proz. Pepsinsalzsäurelösung suspendiert. Sobald das Paranuclein sich ausgeschieden hatte, wurde die Verdauung in a) abgebrochen. Die anderen Proben wurden der Verdauung weiter ausgesetzt. Jede Probe wurde doppelt ausgeführt. Nach Unterbrechung der Verdauung wurde der Kolben auf das ursprüngliche Gewicht gebracht.

Gesamt-N = 0,5484 g (berechnet aus 0,1357 g N / „ „ 0,1385 „ „)

Gesamt-S = 0,02096 g (berechnet aus 0,472 $BaSO_4$ / „ „ 0,576 „)

N : S = 26,4.

a) Nach 48 Stunden:
α) Paranuclein 0,4661 g = 0,00247 g S = 0,53 Proz.
β) „ 0,4783 „ = 0,00226 „ S = 0,47 „
α) Filtrat 0,01654 g S, 0,4872 g N
β) „ 0,01628 „ „ 0,4914 „ „
α) N : S = 29,4 β) N : S = 30,2
α) Paranuclein-S + Filtrat-S = 0,01901 g
β) „ + „ = 0,01854 „

b) Nach 1 Woche:
α) Paranuclein 0,3250 g = 0,00162 g S = 0,49 Proz.
β) „ 0,3215 „ = 0,00155 „ „ = 0,48 „
α) Filtrat 0,01318 g S, 0,5040 g N
β) „ 0,01376 „ „ 0,5025 „ „
α) N : S = 38,2 β) N : S = 36,5
α) Paranuclein-S + Filtrat-S = 0,01479 g
β) „ + „ = 0,01531 „

c) Nach 2 Wochen:
α) Paranuclein 0,3119 g = 0,00236 g S = 0,76 Proz.
β) „ 0,3058 „ = 0,00155 „ „ = 0,506 „
α) Filtrat 0,01596 g S, 0,5062 g N
β) „ 0,01624 „ „ 0,5145 „ „
α) N : S = 31,6 β) N : S = 31,6
α) Paranuclein-S + Filtrat-S = 0,01832 g
β) „ + „ = 0,01779 „

d) Nach 3 Wochen:
α) Paranuclein 0,2485 g = 0,00147 g S = 0,59 Proz.
β) „ 0,2596 „ = — „ „ = — „
α) Filtrat 0,01254 g S, 0,4935 g N
β) „ 0,01572 „ „ 0,4977 „ „
α) N : S = 39,3 β) N : S = 31,6
Paranuclein-S + Filtrat-S = 0,01401 g

Abgesehen von dem Versuch d) stehen die Ergebnisse dieser Reihe mit den früheren in Übereinstimmung, insofern das Filtrat mit der Zeit immer schwefelärmer wird, das Paranuclein aber wenig oder gar nicht schwefelreicher. Im Filtrate wächst der Stickstoff stetig, der Schwefel aber nicht, weder relativ noch absolut, so daß an Verlust oder Bindung des Schwefels gedacht werden muß. Bildet man die Summe des Paranuclein-S und des im Filtrat gefundenen S, so bekommt man nicht die ursprüngliche Menge, sondern eine Zahl, welche mit der Verdauungsdauer geringer wird.

V. Versuchsreihe.

Hier wurden 5 g Kasein in 200 ccm Salzsäure und 2 g Pepsin verdünnt und die Intervalle größer genommen.

Gesamt-N = 0,7075 g, Gesamt-S = 0,023 g
N : S = 30,7.

a) Nach 2 Wochen:
Paranuclein α) 0,6788 g = 0,002759 g S = 0,407 Proz.
β) 0,6341 „ = 0,002086 „ „ = 0,33 „
Filtrat α) 0,01922 g S, 0,611 g N
β) 0,01729 „ „ 0,617 „ „
α) N : S = 33 β) N : S = 28
α) Paranuclein-S + Filtrat-S = 0,02197 g
β) „ + „ = 0,01937 „

b) Nach 6 Wochen:
Paranuclein α) 0,6117 g = 0,002675 g S = 0,39 Proz
β) 0,4506 „ = 0,003006 „ „ = 0,66 „
Filtrat α) 0,016228 g S, 0,6225 g N
β) 0,015230 „ „ 0,6279 „ „
α) N : S = 38 β) N : S = 41
α) Paranuclein-S + Filtrat-S = 0,01889 g
β) „ + „ = 0,01823 „

c) Nach 12 Wochen:

Paranuclein α) 0,4066 g = 0,001524 g S = 0,375 Proz.
β) 0,4151 „ = 0,001716 „ „ = 0,413 „
Filtrat α) 0,01417 g S, 0,6363 g N
β) 0,01540 „ S
α) N : S = 43
α) Paranuclein-S + Filtrat-S = 0,01569 g
β) „ + „ = 0,01711 „

Auch hier ergibt sich, daß die Summe der beiden Schwefelmengen mit der Verdauungsdauer stetig abnimmt und das Verhältnis N : S stetig wächst. Das Paranuclein wird nicht schwefelreicher, trotz der mehrwöchentlichen Verdauungsdauer. —

VI. Versuchsreihe.

Es wurden 4,5 g Kasein mit 2 g Pepsin in 900 ccm Salzsäure gelöst und von Zeit zu Zeit 75 ccm für die Schwefelbestimmung und 25 ccm für die Stickstoffbestimmung abgehebert. Der Kolben war dicht verschlossen und wurde jedesmal gewogen, damit jeder Wasserverlust konstatiert werde. —

1. Nach 24 Stunden: 0,0177 $BaSO_4$ = 0,00324 Proz. S; 10,6 ccm ¹/₄ n-NaOH = 1,3356 Proz. N.
2. Nach 72 Stunden: 0,0193 $BaSO_4$ = 0,00353 Proz. S; 11,0 ccm ¹/₄ n-NaOH = 1,540 Proz. N.
3. Nach 240 Stunden: 0,0217 $BaSO_4$ = 0,003968 Proz. S.
4. Nach 23 Tagen: 11,6 ccm ¹/₄ n-NaOH = 1,624 Proz. N.
5. „ 30 „ 11,7 „ „ „ = 1.638 „ „
6. „ 44 „ 0,0215 g $BaSO_4$ = 0,00394 Proz. S; 11,7 ccm ¹/₄ n-NaOH = 1,638 Proz. N.
7. Nach 68 Tagen: 0,0256 g $BaSO_4$ = 0,00468 Proz. S; 11,6 ccm ¹/₄ n-NaOH = 1,624 Proz. N.

Paranuclein 0,5646 g = 0,0187 g $BaSO_4$ = 0,002569 g S = 0,45 Proz. S.

Dieser Versuch zeigt, daß, sei es wegen der langsamen Verdauung, welche infolge der Abnahme des Volumens träge vonstatten ging, sei es wegen des Verschlossenbleibens des Gefäßes, das früher beobachtete Verschwinden des Schwefels ausblieb. Im Gegenteil nimmt der Gehalt des Filtrates, d. h. der Kaseosenlösung an Schwefel mit der Zeit stetig zu, gleichsinnig mit dem Stickstoffgehalt. Dem entsprechend ist auch das Verhältnis des N zu S fast konstant.

Nach 24 Stunden 41
„ 72 „ 43
„ 30 Tagen 42
„ 68 „ 34.

Das Paranuclein enthielt nach der langen Verdauung 0,45 Proz. S; es lag also keine besondere Steigerung vor, da wir für den Schwefel-

gehalt des Kaseins je etwa 0,34 Proz. — 0,40 Proz. — 0,46 Proz. gefunden hatten. —

Es ergibt sich des weiteren, daß nur die ersten Tage, ja sogar nur die ersten Stunden besonders starken Einfluß auf die Verhältnisse ausüben, nach einiger Zeit bleibt das Paranuclein ohne Veränderung in der Verdauungsflüssigkeit. Die Abspaltung von Stickstoff und Schwefel hört auf.

VII. Versuchsreihe.

In dieser Reihe wurde auf zwei Umstände besonders geachtet: 1. auf den Unterschied zwischen der Verdauung in bedeckten und offenen Gefäßen; 2. auf den Einfluß der Verdünnung.

Das Kasein war von E. Merck bezogen und enthielt:

13,13 Proz. N und 0,377 Proz. S.

1. 10 g Kasein, 2 g Pepsin, 200 ccm Salzsäure mit dem Gesamt-N 1,313 g und 0,0377 g S; N : S = 29.

Nach 48 Stunden:

Paranuclein 1,3612 g = 0,006027 g S = 0,443 Proz. S
Filtrat 0,03135 g S, 1,128 g N
„ 0,02746 „ „ 1,231 „ „
N : S = 40; Filtrat-S + Paranuclein-S = 0,035.

2. 10 g Kasein, 2 g Pepsin, 1000 ccm HCl.

Nach 48 Stunden:

Paranuclein 0,6284 g = 0,004695 g S = 0,74 Proz. S
Filtrat 0,02739 g S, 1,148 g N
„ 0,02588 „ „ 1,050 „ „
N : S = 40,1; Filtrat-S + Paranuclein-S = 0,031.

Man sieht den Einfluß der Verdünnung an der Paranucleinmenge, die hier 6 Proz. des Gesamtkasein ausmacht, während sie im Versuch 1 13 Proz. betrug.

3. 10 g Kasein, 2 g Pepsin, 250 ccm HCl.

Nach 1 Monat:

Paranuclein 0,6889 g = 0,00208 g S = 0,329 Proz. S
Filtrat 0,020869 g S, 1,260 g N
„ 0,021212 „ „ 1,260 „ „
N : S = 60; Filtrat-S + Paranuclein-S = 0,023.

4. 10 g Kasein, 2 g Pepsin, 200 ccm HCl.

Nach 1 Monat:

Paranuclein 0,6644 g = 0,077 g N
Filtrat 1,251 g N
„ 1,250 „ „

5. 10 g Kasein, 2 g Pepsin, 1000 ccm HCl. — Verschlossen gehalten.

Nach 1 Monat:

Paranuclein 0,3713 g = 0,00168 g S = 0,45 Proz. S
Filtrat 0,02299 g S } 1,288 g N
„ 0,02107 „ „ }
N : S = 58,1; Filtrat-S + Paranuclein-S = 0,0237.

6. 10 g Kasein, 2 g Pepsin, 1000 g HCl.
Offen. Nach 1 Monat:
Paranuclein 0,4008 g = 0,00256 g S = 0,64 Proz. S
Filtrat 0,01880 g S, 1,281 g N
„ 0,01916 „ „ 1,275 „ „
N : S = 67; Filtrat-S + Paranuclein-S = 0,0215.

7. 10 g Kasein, 10 g Pepsin, 1000 g HCl.
Verschlossen. Nach 1 Monat:
Paranuclein 0,2331 g = 0,000832 g S = 0,35 Proz. S
Filtrat 0,02183 g S, 1,295 g N
„ 0,01462 „ „
N : S = 71; Filtrat-S + Paranuclein-S = 0,019.

Man sieht ohne weiteres, daß die Verdünnung die Zersetzung des Paranucleins stärker beeinflußt als die Zeitdauer. Alle Verdauungsproben, welche einen Monat gestanden hatten, zeigten geringe Paranucleinmengen, aber die geringsten Werte finden sich da, wo die Verdünnung mitwirkte.

Vergleicht man die Ergebnisse der Verdauung in offenen und in geschlossenen Kolben, so ist unbestreitbar in jenen der Verlust an Schwefel größer. —

Ein größerer Zusatz von Pepsin bewirkt nicht nur eine viel intensivere Verdauung, sodaß das Paranuclein auf 2 Proz. des Gesamtkaseins reduziert wird, sondern, was besonders zu betonen ist, einen größeren Verlust an Schwefel.

Der Gehalt des Paranucleins an Schwefel bleibt von der Verdünnung und der Verdauungsdauer unbeeinflußt.

Zusammenfassung.

Aus den angeführten Versuchsergebnissen ist zu entnehmen, daß der Schwefelgehalt des Paranucleins, im Gegensatz zum Phosphorgehalt, sehr wenig durch die Verdauungsdauer oder durch die Konzentration beeinflußt wird.

Mag das Paranuclein 12 Proz., 8 Proz. oder 6 Proz. der ursprünglichen Kaseinmenge betragen, immer schwankt sein S-Gehalt zwischen 0,32 und 0,40 Proz. S*). In einzelnen Versuchen sank die Menge des Paranucleins auf 2 Proz., und trotzdem war sein Schwefelgehalt 0,35 Proz., also verhältnismäßig sehr niedrig.

Bei mässiger Konzentration macht das Paranuclein 12 Proz. des angewandten Kaseins aus, wenn man die Verdauung gleich nach der Abscheidung des Paranucleins abbricht. — Bei stärkerer

*) Wir haben nur ausnahmsweise 0,67 — 0,59 — 0,74 Proz. S im Paranuclein gefunden in Fällen, wo das Paranuclein 4 bis 6 Proz. des Kaseins ausmachte.

Verdünnung ist die Menge nach der gleichen Zeitdauer um die Hälfte geringer.

Ist die Konzentration groß, so bleibt die Menge des Paranucleins unverändert, trotz sehr langer Versuchsdauer. Will man also wenig Paranuclein erhalten, so wählt man möglichst verdünnte Lösungen.

Reichlicher Pepsinzusatz wirkt wie die Verdünnung. Die relative Menge des entstandenen Paranucleins läßt keine Beziehung zu seinem Schwefelgehalt erkennen.

Die Kaseosenlösungen enthalten 80 Proz. des Gesamtstickstoffes, wenn man die Verdauung frühzeitig unterbricht; mit der Dauer der Verdauung nimmt ihr Stickstoffgehalt zu und nähert sich asymptotisch dem Gesamtstickstoff. Alles was für die Verdauung des Paranucleins gilt, gilt natürlich für den Gehalt der Kaseosenlösung an Stickstoff; somit ist bei großer Verdünnung und reichlichem Pepsinzusatz der Gehalt der Kaseosenlösung an Stickstoff am größten.

Dasselbe war auch für den Schwefel der Kaseosenlösung zu erwarten. Es war eine Überraschung, als sich aus allen Versuchen ein deutlicher Verlust an Schwefel ergab. So lange man den Gehalt des Paranucleins an Schwefel nicht kannte, konnte man eine Anhäufung des Schwefels im Paranuclein annehmen; als aber die Untersuchung ergab, daß unter allen Umständen der Schwefelgehalt des Paranucleins der gleiche bleibt (nie wurden 0,7 Proz. überschritten), somit wenig Paranuclein auch wenig Schwefel enthält, mußte diese Annahme fallen gelassen werden. —

Es war nun anzunehmen, daß sich der Schwefel bei der Verdauung verflüchtige. In der Tat ergab sich, daß in offenen Gefäßen der Verlust viel bedeutender war als in geschlossenen. Ein Versuch, die flüchtigen Produkte durch Schwärzung von Bleisalzen zu entdecken, führte nicht zum Ziele, vielleicht weil die Menge des Schwefels, die hier in Betracht kommt, zu unbedeutend ist.

Der Schwefelverlust tritt besonders deutlich in dem Verhältnis des Stickstoffs zum Schwefel hervor, welches bei längerer Verdauung beständig wächst.

Aber nicht nur das Offenbleiben der Gefäße, sondern auch die regere Verdauung befördert den Verlust an Schwefel. So ergab sich da, wo der Pepsinzusatz am stärksten war, auch der größte Schwefelverlust. Man muß wohl annehmen, daß zur Bildung des schwefelhaltigen flüchtigen Produktes eine möglichst vollständige Zersetzung notwendig ist.

Schlußfolgerungen.

1. Der Gehalt des Paranucleins an Schwefel ist so gut wie konstant und von der Verdauungsdauer unabhängig.

2. Während der Verdauung geht ein Teil des Schwefels verloren und zwar wächst die Menge des verlorengegangenen Anteils mit der Intensität der Verdauung.

XXXIV.
Die Purinbasen der Heringslake.*)

Von Dr. **S. Isaac.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Wie S. Schmidt-Nielsen**) mitgeteilt hat, finden sich in der käuflichen Heringslake Purinbasen in beträchtlicher Menge. Die leichte Zugänglichkeit des im übrigen wertlosen Materials ließ es wünschenswert erscheinen, ein Verfahren zu ihrer Darstellung auszuarbeiten und sie ihrer chemischen Natur nach zu identifizieren. War zunächst auch der praktische Gesichtspunkt maßgebend, auf diesem Wege ein vielleicht ausgiebiges Ausgangsmaterial zur Gewinnung der zum Teil immer noch schwer erhältlichen Purinbasen zu erschließen, so kamen doch auch biologische Gesichtspunkte in Betracht, insofern festgestellt werden sollte, welche Basen und namentlich, ob auch methylierte Derivate derselben gerade bei dieser Art von Autolyse auftreten.

I.

Zur Darstellung wurde folgendes Verfahren eingeschlagen, das sich bei mehrmaliger Wiederholung des Versuchs bewährte.

Ungefähr 100 Liter in der kalten Jahreszeit bezogene Heringslake des Handels wurden zur Ausfällung des Eiweißes mit konzentrierter Salpetersäure versetzt. Die nach Entfernung des Eiweißniederschlages resultierende klare Flüssigkeit wurde mit konzentriertem Ammoniak alkalisch gemacht, von den ausgefallenen Phosphaten abfiltriert, dann mit ammoniakalischer Silberlösung versetzt, solange noch ein Niederschlag entstand. Hierauf wurde die gesamte Menge der voluminösen Silberverbindungen gründlich ausgewaschen, auf dem Wasserbade mit verdünnter Salzsäure zerlegt, bis sich das entstandene Chlorsilber völlig zu Boden setzte.

---

*) Ausführlicher mitgeteilt in der Dissertation des Verfassers: Über das Auftreten von Purinbasen bei der Autolyse, Straßburg, Müh u. Co. 1903.

) Diese Beiträge **3, 270.

Die abfiltrierte Flüssigkeit, welche also die Purinbasen in Form ihrer salzsauren Salze in Lösung hielt, gab mit Ammoniak sofort einen reichlichen Niederschlag. Seine Menge betrug trocken etwa 20 g. Der Niederschlag, der wegen seiner Unlöslichkeit in Ammoniak als Guanin angesprochen werden mußte, lieferte ein in Nadeln kristallisierendes Hydrochlorat, das charakteristische Doppelbrechung zeigte.

Die freie Base, durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Salzsäure und nachfolgende Neutralisation mit Ammoniak als reines, weißes Pulver gewonnen, gab Analysenzahlen, die ihre Identität mit Guanin nicht zweifelhaft erscheinen lassen.

Für $C_5H_5N_5O$

berechnet:	gefunden:
C 39,67 Proz.	39,77 Proz.
H 3,32 „	3,41 „
N 46,42 „	46,49 „

Auch das Guaninpikrat, das aus seidenglänzenden Nadeln bestand und durch Versetzen der salzsauren Guaninlösung mit kalt gesättigter wässeriger Pikrinsäurelösung hergestellt war, gab die verlangten Werte:

Für $C_5H_5N_5O . C_6H_2(NO_2)_3 . OH$

berechnet:	gefunden:
N 29,47 Proz.	29,28 Proz.

Bei der weiteren Untersuchung hielt ich mich an das Verfahren, das Krüger und Wulff*) ausgearbeitet und bei der Trennung der Purinbasen des Harns mit Erfolg verwertet haben. Es beruht auf dem verschiedenen Verhalten dieser Körper bezüglich der Dissoziierbarkeit ihrer salzsauren Salze in Wasser. Krüger und Wulff konnten so zwei Fraktionen unterscheiden: die Hypoxanthinfraktion, bestehend aus Epiguanin, Adenin, Hypoxanthin, deren Hydrochlorate sich schwer zersetzen, und die leicht dissoziierbare Xanthinfraktion mit Xanthin und seinen Homologen.

Um diese Trennung durchzuführen, wurde das Guaninfiltrat neuerdings mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt, der Niederschlag mit Salzsäure zerlegt und die vom Chlorsilber befreite Flüssigkeit auf dem Wasserbade bis zur Trockne und hierauf zur Beseitigung überschüssiger Salzsäure noch mehrere Male mit 95proz. Alkohol eingedampft. Das resultierende, grobkörnige Pulver — es waren trocken 30 g — wurde bei 50° mehrere Stunden mit 250 ccm Wasser digeriert und dann einige Zeit

*) Zeitschrift f. physiol. Chem. **26**, 350.

stehen gelassen. Ein Teil des Basengemisches hatte sich dissoziiert, da sich am Boden des Gefäßes ein nicht unbeträchtlicher Rückstand vorfand.

1. Behandlung des vom Rückstand getrennten Filtrates.

Da Epiguanin nicht vorhanden war — es hätte wegen seiner Schwerlöslichkeit in Ammoniak schon mit dem Guanin ausfallen müssen — wurde die Flüssigkeit mit 1proz. Pikrinsäurelösung versetzt und der entstandene Niederschlag sofort abgesaugt. Nach einmaligem Umkristallisieren — es waren 1,5 g — bestand er aus einer glänzenden, verfilzten Masse, die bei 100° getrocknet, ihren Glanz verlor. Die Analyse ergab, daß hier pikrinsaures Adenin vorlag.

Für $C_5H_5N_5 . C_6H_2(NO_2)_3 OH$

	berechnet:	gefunden:
C	36,23 Proz.	36,63 Proz.
H	2,21 „	2,19 „
N	30,83 „	30,97 „

Das Filtrat des pikrinsauren Adenins wurde zur Gewinnung des noch in Lösung gebliebenen Adenins auf dem Wasserbade eingeengt, nochmals mit Pikrinsäure versetzt und der Niederschlag sofort abgesaugt. Hierdurch wurden noch 2 g Adeninpikrat gewonnen.

Die restierende Flüssigkeit wurde zur Entfernung der überschüssigen Pikrinsäure mit Benzol geschüttelt, mit ammoniakalischer Silberlösung versetzt, und die entstandene Silberverbindung mit Salzsäure zerlegt. Durch Eindampfen der salzsauren Lösung mit Ammoniak wurden 5 g freie Base gewonnen. Zur Reinigung wurde dieselbe in 100 ccm Salpetersäure in der Wärme gelöst. Beim Erkalten schied sich das Nitrat aus, welches bei mikroskopischer Betrachtung große wasserhelle Kristalle erkennen ließ. Es handelte sich hier um Hypoxanthinnitrat.

Für $C_5H_4N_4O . NO_3H + H_2O$

	berechnet:	gefunden:
N	32,25 Proz.	31,86 Proz.

Das freie Hypoxanthin schied sich nach dem Einengen der salpetersauren Lösung auf Zusatz von Ammoniak aus.

Für $C_5H_4N_4O$

	berechnet:	gefunden:
C	44,11 Proz.	44,54 Proz.
H	2,96 „	2,93 „
C	41,26 „	41,34 „

2. Behandlung des Rückstandes.

In dem Rückstande, — es waren 6 g — von dem eine Probe beim Verdampfen mit Salpetersäure einen gelben Fleck hinterließ, der sich beim Befeuchten mit Natronlauge rot färbte, wurde zunächst nur Xanthin vermutet. Eine Stickstoffbestimmung ergab 40,32 Proz. N. Xanthin hat aber nur einen Stickstoffgehalt von 36,92 Proz. Es mußte ihm also ein stickstoffreicherer Körper beigemengt sein.

Daher wurde der Rückstand in Ammoniak gelöst, mit Silbernitrat gefällt, die Silberverbindung dann in heißer Salpetersäure von 1,1 spezif. Gew. gelöst. Schon beim Filtrieren der siedenden Flüssigkeit kristallisierte ein salpetersaures Silberdoppelsalz aus, das unter dem Mikroskop aus prächtigen Drusen großer Nadeln bestand. Es ergab

$$C = 20,78 \text{ Proz.}, H = 1,83 \text{ Proz.}, N = 23,86 \text{ Proz.}$$

Diese Werte nähern sich denen von Hypoxanthin-Silbernitrat: $C_5H_4N_4O . NO_3Ag$ verlangt:

$$C = 19,60 \text{ Proz.}, H = 1,31 \text{ Proz.}, N = 23,03 \text{ Proz.}$$

Letztere Verbindung ist aber nicht konstant und meist mit einem anderen Silbersalz des Hypoxanthins vermengt, woraus sich die Differenz erklären dürfte. Durch Zersetzen der Silberverbindung mit Schwefelwasserstoff wurde ein Körper gewonnen, dessen Analyse bestätigte, daß hier wiederum Hypoxanthin vorlag; es hatte sich also wider Erwarten ein Teil seines Hydrochlorats dissoziiert.

Für $C_5H_4N_4O$

	berechnet:	gefunden:
C	44,11 Proz.	44,48 Proz.
H	2,96 „	3,23 „

Das Filtrat des Silbersalzes, das bei längerem Stehen keine Kristallisation mehr zeigte, gab mit Ammoniak eine Fällung. Dem ganzen Verhalten nach dürfte es sich hier um Xanthin gehandelt haben. Die geringe Ausbeute ließ mich von weiterer Untersuchung abstehen.

Somit wurden in der Heringslake gefunden: Guanin, Adenin, Hypoxanthin und wahrscheinlich auch Xanthin. Am reichlichsten war die Ausbeute an Guanin und Hypoxanthin, spärlicher an Adenin; in ganz untergeordneter Menge schließlich an Xanthin. Für eine spätere Darstellung wird sich wohl ein einfacheres Verfahren als das von mir geübte empfehlen, nämlich das Filtrat des Guanins nach Entfernung des Ammoniaks mit Pikrinsäure auszufällen und das Hypoxanthin von den kleinen Mengen Xanthin nach einer der bekannten Methoden zu trennen.

II.

Es erhebt sich nun die Frage nach der Herkunft der Purinbasen der Lake. Über die Vorgänge beim Pökeln der Heringe sind wir durch Schmidt-Nielsen*) genau unterrichtet.

„Gleich nach dem Fange werden die Heringe mehr oder weniger ausgemacht („gekehlt"), d. h. Kiemen, Magensack, Darm usw. werden teilweise entfernt, ohne daß Rogen und Milch mitgerissen werden, wonach sie gleich lagenweise mit Salz in die Tonnen gepackt werden. Nachdem die letzte Lage fertig ist, wird die Tonne mit einer Salzlake aufgefüllt und der Deckel zugemacht. Nach Verlauf von 8 bis 14 Tagen oder mehr sind die Heringe gewöhnlich fertig gepökelt, d. h. sie sind reif geworden und direkt zum Essen verwendbar. Ehe die Heringe in den Konsumhandel kommen, werden sie umgepackt. Beim Umpacken wird mit Ausnahme der untersten und obersten Lage kein neues Salz zugefügt. Das von dem zuerst angewandten etwa nicht gelöste Salz wird von der Lake abgesiebt, ehe sie wieder in die Tonne eingefüllt wird."

Letztere Angabe ist von Bedeutung, da sie zeigt, daß die Heringe vom ersten Pökeln bis zum Verkauf im Kleinhandel immer in derselben Lake bleiben, sodaß diese sich mit Produkten der Autolyse sättigen kann.

Wenn sich Verschiedenheiten in der Lake herausstellen, so sind sie daher vermutlich auf die ungleiche Beschaffenheit des Ausgangsmaterials zu beziehen. In dieser Hinsicht besteht, wie Schmidt-Nielsen hervorhebt, „ein großer Unterschied zwischen den fetten Sommerheringen mit ihrem reichlichen Peritonealfett, den mageren geschlechtsreifen Heringen mit ihrem Inhalt von Rogen und Milch (Hoden) und schließlich den leeren ausgelaichten Heringen (Hohlheringen)."

Auf Grund dieses Vorgehens beim Pökeln können verschiedene Teile des Fisches als Ausgangspunkt für die Bildung der Basen in Anspruch genommen werden:

1. Die Haut mit ihren Schuppen, da in diesen, wie von einer Reihe von Autoren gezeigt wurde, Guanin bei Knochenfischen sehr verbreitet ist.

2. Die Muskeln, die ja die Hauptmenge der Fischkörper ausmachen und sicher Purinbasen bei der Autolyse abzugeben in der Lage sind.

---

*) Der Reifungsvorgang beim Pökeln von Heringen. Det Kgl. Norske videnskabens selskabs Skrifter 1901, Nr. 5. Trondhjem 1902, S. 10.

3. Die Hoden geschlechtsreifer Heringe. In letzterem Falle war zu erwarten, daß die Lake von Hohlheringen keine oder nur wenig Purinbasen enthalten sollte.

Zur Entscheidung dieser Frage habe ich:

1. Haut und Schuppen vom Schellfisch,
2. Fleisch vom Schellfisch

einer länger dauernden Autolyse bei 40° unter Toluol unterworfen, aber mit negativem Resultat, insofern Purinbasen sich kaum nachweisen ließen. Auch gehört Guanin zu den Basen, die sich nur in sehr geringer Menge im Fleische finden.

Demgegenüber hat die Annahme etwas Bestechendes, daß die Purinbasen zum größten Teil den Nucleinsubstanzen der Hoden entstammen.

Matthews*) stellte aus den Spermatozoenköpfen des Herings, die er nach Mieschers Vorgang durch Zentrifugieren des in Wasser suspendierten Spermas erhalten hatte, die uns hier interessierende nucleinsaure Verbindung des Clupeins dar. Seine Analysen ergaben damals, daß die Nucleinsäure des Heringsspermas mit derjenigen der Lachsmilch der Zusammensetzung nach identisch ist.

Nun hat Schmiedeberg**) bekanntlich festgestellt, daß die Salmonucleinsäure bei der Spaltung nur Adenin und Guanin liefert. Mit der naheliegenden Annahme, daß auch die Nucleinsäure des Heringsspermas eine Guanin-Adenin-Säure ist, läßt sich mein Befund gut in Einklang bringen. Guanin habe auch ich in so reichlicher Menge gefunden, daß es nur der Nucleinsäure entstammen kann; die Muskeln kommen hier bezüglich ihres Guaningehaltes nicht in Betracht. Adenin fand sich auch, freilich in geringerer Menge. Der Annahme, daß die genannten Basen aus der Nucleinsäure stammten, steht aber die beträchtliche Menge des Hypoxanthins entgegen. Wenn es auch nicht ausgeschlossen ist, daß es dem Fleische entstammt, etwa einer der Haiserschen Inosinsäure***) entsprechenden Verbindung, so bedarf es doch der Diskussion, ob nicht Adenin eine Umwandlung zu Hypoxanthin erfahren hat. Weisen doch Burian und Walker Hall†) in einer kürzlich erschienenen Arbeit wieder darauf hin, daß in Organextrakten durch eine „ganz geringe, nicht ohne weiteres wahrzunehmende Fäulnis“ Aminopurine in Oxypurine übergeführt

*) Zeitschrift f. physiol. Chem. **23**, 399.
) Archiv f. exper. Pathol. **44, 71 (1900).
***) Monatshefte für Chemie. **16**.
†) Zeitschrift f. physiol. Chem. **38**, 336.

Tabelle I.

Hund I, operiert am 14/4. 1904.

Tag	Harnmenge in ccm	Zucker in Proz.	Zucker in g	Fütterung; Bemerkungen
19. April mittags bis 20. April mittags	235	7,3	17,2	200 g Fleisch
20. April mittags bis 21. April mittags	255	6,65	16,9	200 g Fleisch
21. April mittags bis 22. April mittags	245	7,05	17,2	200 g Fleisch
22. April mittags bis 23. April mittags	225 (ungenau)	7,6	17,1	200 g Fleisch Vor der Abmessung einige ccm verloren
23. April mittags bis 24. April mittags	?	—	—	100 g Fleisch Der Hund erhält mit 100 g Fleisch 30 g i.-Alanin, danach lebhaftes Erbrechen
24. April mittags bis 25. April mittags	200	8,0	16	200 g Fleisch
25. April mittags bis 26. April mittags	**558**	**5,25**	**29,3**	200 g Fleisch 14 g Alanin per os. 20 g Alanin subkutan. Kein Erbrechen
26. April mittags bis 27. April mittags	255	7,55	19,3	200 g Fleisch

Es ergibt sich aus Tabelle I, daß die Zuckerausscheidung, nachdem sie während 5, dem Versuchstage vorausgehender Tage fast konstant etwa 16 bis 17 g betragen hatte*), nach Verabreichung von 34 g Alanin auf 29,3 g emporschnellte, um am nächsten Tage fast (19,3 g) wieder auf den Normalwert abzusinken.

Der zweite Versuch wurde in etwas anderer Weise angestellt. Der Hund wurde nach der Operation überhaupt nicht gefüttert und dadurch auf eine niedrige Zuckerausscheidung gebracht. Alsdann wurden ihm im Laufe eines Tages 20 g Alanin in wässeriger Lösung mittelst Schlundsonde beigebracht. Dann folgte ein Normaltag, worauf dem Hunde nochmals 20 g Alanin in wässeriger Lösung, diesmal durch subkutane Injektion, zugeführt wurden. Das Weitere ist aus Tabelle 2 ersichtlich.

*) An einem Tage war, wie aus der Tabelle ersichtlich, die Fütterung eine abweichende und wegen Erbrechens eine genaue Zuckerbestimmung nicht ausführbar.

Tabelle II.

Hund II, operiert am 28/4. 1904*).

Tag	Harnmenge in ccm	Zucker in Proz.	Zucker in g	Fütterung; Bemerkungen
3. Mai bis 4. Mai	170	2,8	4,8	Kein Futter
4. Mai bis 5. Mai	130	1,7	2,2	Kein Futter
5. Mai bis 6. Mai	187	2,5	4,6	Kein Futter
6. Mai bis 7. Mai	110	2,25	2,5	Kein Futter
7. Mai bis 8. Mai	**547**	**3,47**	**18,9**	Kein Futter Dem Hunde werden in 3 Portionen 20 g i.-Alanin mit Schlundsonde beigebracht
8. Mai bis 9. Mai	335	1,85	6,2	Kein Futter Diarrhoische Entleerungen, mit denen der Harn verunreinigt ist
9. Mai bis 10. Mai	**633**	**3,08**	**19,5**	Kein Futter Dem Hunde werden 20 g i.-Alanin, in 140 ccm Wasser gelöst, in 2 Portionen subkutan injiziert. Keine Diarrhoe
10. Mai bis 11. Mai	340	1,05	3,6	Kein Futter

In drei, an zwei verschiedenen Hunden angestellten Versuchen ergab sich also übereinstimmend, daß Zuführung von Alanin beim pankreasdiabetischen Hunde einen sehr erheblichen und sehr schnell erfolgenden Anstieg der Zuckerausscheidung bewirkt. Die Steigerung der Zuckerausscheidung kam in den beiden Versuchen an Hund II dem Gewicht nach erheblich mehr als der Hälfte des verfütterten inaktiven Alanins gleich. Nach dem Aufhören der Alaninfütterung tritt alsbald wieder annähernd die vorherige Zuckerausscheidung ein.

Die Frage, ob es sich in den vorliegenden Versuchen um einen direkten Übergang von Alanin in Zucker (etwa unter intermediärer Milchsäurebildung) handelt, oder ob der Chemismus ein andersartiger ist, soll an dieser Stelle nicht erörtert werden.

*) In den Tabellen sind der Berechnung die polarimetrisch gewonnenen Zahlen zugrunde gelegt.

Kürzere Mitteilungen.

7. Die Verwendbarkeit der Orcinprobe von Bial zum Nachweis der Glykuronsäure.

Von E. C. van Leersum (Amsterdam).

Aus dem Laboratorium Pathologicum der Universität Amsterdam. (Direktor: Prof. Ruitenga.)

M. Bial hat ein Verfahren angegeben*), mittelst dessen man auch die schwer spaltbaren Verbindungen der Glykuronsäure leicht auffinden kann. Als Reagens verwendet er Orcin und rauchende Salzsäure, worin ein wenig Eisenchlorid gelöst ist. Der blaugrüne Farbstoff, welcher beim Erhitzen des Harnes mit dem Reagens auftritt, und im Spektrum einen Absorptionsstreifen an der Grenze von Rot und Orange zeigt, soll charakteristisch für Glykuronsäure sein. In der Tat wird durch den Zusatz von Eisenchlorid die Empfindlichkeit der Orcinprobe wesentlich gesteigert, wie ich an sehr schwachen Lösungen von Glykuronsäure, die ohne Eisenchlorid gar keine Verfärbung zeigten, beobachten konnte. In dieser Steigerung der Empfindlichkeit soll jedoch nach P. Mayer**) und Brat***) ein gewisser Nachteil liegen. Brat meint, „daß die Verschärfung der Orcinprobe durch den Zusatz des Eisenchlorids nicht ohne Herabsetzung der Eindeutigkeit derselben bestehen kann."

Die Richtigkeit dieser Bemerkung konnte ich bei der Untersuchung einer Anzahl normaler Harne bestätigen, die keine Reduktions- und Drehungserscheinungen, auch nicht nach Erhitzen mit Schwefelsäure im Autoklaven, darboten. Nachdem sich herausgestellt hatte, daß ein erhöhter Zusatz von Eisenchlorid die Reaktion nicht beeinträchtigt, habe ich, behufs kräftigerer Spaltung, statt des Bialschen Reagens dasjenige von Obermeyer (4 g festes Eisenchlorid in 1 Liter rauchender Salzsäure) angewendet. Zwar macht die intensiv gelbe Farbe des Obermeyerschen Reagens die Beurteilung der Farbenänderung schwieriger, jedoch fällt bei Aufnahme des Farbstoffs in Amylalkohol diese Schwierigkeit fort.

Die von mir untersuchten Harne reagierten beim Erhitzen mit Obermeyerschem Reagens und Orcin alle positiv. Dies lenkte meine Aufmerksamkeit auf das normale Vorkommen von Spuren Glykose im Harne. Zu meiner Überraschung gab eine Lösung von Glykose, sogar eine von

---

*) Deutsche med. Wochenschr. 15, 254 (1902).

**) Berl. klin. Wochenschr. 1903, S. 292.

***) Zeitschr. f. klin. Medizin 47, 499.

0,1 pro Mille, dieselben Erscheinungen. Der gebildete Farbstoff ist ohne Zweifel identisch mit dem, welcher in normalem Harne und reinen Glykuronsäurelösungen auftritt.

Ich habe den Farbstoff auf folgende Weise gereinigt. Die amylalkoholische Lösung wurde mit destilliertem Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen. Die Farbe änderte sich dabei in braunrot. Weiter wurde der Stoff mit schwacher Kalilauge extrahiert, die alkalische Lösung mit Essigsäure angesäuert und dann mit Äther geschüttelt, in den der Farbstoff leicht übertrat. Nach Verdunsten des carmoisinfarbenen Äthers blieb ein grünlichblauer Rückstand.

Von den auf diese Weise aus Harn, Glykuronsäure und Glykose hergestellten Farbstoffen wurden gleichstarke amylalkoholische Lösungen spektroskopisch untersucht: Sie zeigten alle drei genau dasselbe Spektrum.

Offenbar handelte es sich bei der Einwirkung der Orcin-Eisenchlorid-Salzsäure auf Glykose und Glykuronsäure um dasselbe Spaltungsprodukt und es schien mir von besonderem Wert, dieses Produkt näher zu bestimmen.*)

Zu diesem Zweck unterwarf ich ein Gemisch von Glykoselösung und Obermeyerschem Reagens der Destillation. Das Destillat enthielt, neben anderen Verbindungen als: Ameisensäure, einen Aldehyd, welcher nach Neutralisieren und wiederholtem Destillieren über Chlorcalcium, oder auch mittelst Ätherextraktion, isoliert werden konnte. Er hatte eine schwach gelbe Farbe, roch nach Furfurol, reduzierte Fehlingsche Flüssigkeit und nahm nach Zusatz von Anilinöl (in Alkohol) und Eisessig eine rote Farbe an. Phenylhydrazin in Essigsäure rief einen Niederschlag von dünnen, viereckigen Plättchen hervor, welche zwischen gekreuzten Nikols ein schönes Farbenspiel zeigten. Der Schmelzpunkt dieses Hydrazons lag bei 94° C. Die p-Nitrophenylhydrazinverbindung (besonders leicht herzustellen) bestand aus rotbraunen, schwach gebogenen Nadeln, deren Schmelzpunkt zwischen 122 bis 124° C lag.

Es unterliegt also keinem Zweifel, daß dieser Aldehyd mit Furfurol identisch ist. Das so erhaltene Furfurol zeigte nun beim Erhitzen mit dem Bialschen Reagens dieselben Farben- und Spektralerscheinungen wie Glykose und Glykuronsäure. Aber auch ohne Zusatz von Eisenchlorid, also bei der gewöhnlichen Orcinprobe traten diese Erscheinungen auf, was von Interesse ist im Hinblick auf die Angabe Neubergs**), daß mit reinem Furfurol die Orcinreaktion nicht oder nur schwach eintritt. Nach diesem Autor erscheint die Annahme einer Furfurolbildung bei der Orcinreaktion durchaus fraglich, und ist es viel wahrscheinlicher, daß die Farbstoffbildung auf einer Kondensation der angewandten Phenole (Orcin usw.) mit Humussäuren beruht.

Um dem Einwand, das dargestellte Furfurol sei nicht rein gewesen, zu begegnen, habe ich das p-Nitrophenylhydrazon des Furfurols der Spaltung unterworfen. Das gelingt mit Hilfe von Benzaldehyd oder von

*) Während ich mit der Beantwortung dieser Frage beschäftigt war, erschien eine Mitteilung von Bial (Zeitschr. f. klin. Medizin 50, 417), der ebenfalls in der Orcin-Salzsäure-Eisenchlorid-Probe ein Mittel zur Auffindung von Kohlehydraten erkannt hat, und nicht nur von Kohlehydraten als solchen, sondern auch von Kohlehydratgruppen in gewissen Eiweißstoffen. Bial fand, daß die eine Kohlehydratgruppe enthaltenden Eiweißarten positiv reagierten, Kasein dagegen negativ. Ich kann hinzufügen, daß dieses letztere auch mit Edestin der Fall ist.

**) Zeitschr. f. physiol. Chemie 31, 571.

Formaldehyd, wenn man genau so verfährt, wie Herzfeld*) und Ruff und Ollendorff**) behufs Regenerierung der Glykose aus ihrem Osazon angegeben haben. Kocht man das p-Nitrophenylhydrazon mit der passenden Quantität Benzaldehyd oder Formaldehyd in Wasser, dann wird Furfurol in Freiheit gesetzt, wovon man sich leicht überzeugen kann, wenn man einen in Anilinöleisessig getränkten Papierstreifen über die Öffnung des Gefäßes hält (rote Färbung). Die Darstellung des Furfurolhydrazons im Destillat bietet jedoch wegen der Anwesenheit von Benzaldehyd bzw. Formaldehyd erhebliche Schwierigkeiten.

Bessere Resultate bekommt man aber, wenn man das Hydrazon mit Salzsäure spaltet, wie es E. Fischer***) beim Glykosazon getan hat. Ungefähr 250 mg p-Nitrophenylhydrazon von Furfurol (aus Glykuronsäure oder Glykose hergestellt) wurde in 100 ccm 5 proz. Salzsäure suspendiert, während einer halben Stunde am Rückflußkühler gekocht und nachher der Destillation unterworfen. Das schwach gelbe, nach Furfurol riechende Destillat war imstande, Fehlingsche Flüssigkeit zu reduzieren, gab eine schöne Anilinreaktion und lieferte mit p-Nitrophenylhydrazin wieder das bekannte Hydrazon, dessen Schmelzpunkt bei 124° C gefunden wurde. Außerdem war die Bialsche Reaktion, wie auch die gewöhnliche Orcinprobe stark positiv.

Es unterliegt somit keinem Zweifel, daß bei der Orcinprobe mit oder ohne Eisenchloridzusatz aus Glykose und Glykuronsäure Furfurol abgespalten wird. Ob und inwieweit dieses beim Zustandekommen der Orcinreaktion beteiligt ist, bleibe dahingestellt. Jedenfalls geht aus meinen Erfahrungen hervor, daß das Bialsche Reagens nur unter bestimmten Umständen für den Nachweis der Glykuronsäure zu verwerten ist.

Amsterdam, 27. Mai 1904.

*) Berichte d. chem. Gesellsch. 28, 442 (1895).
**) Berichte d. chem. Gesellsch. 32, 3234 (1899).
***) Berichte d. chem. Gesellsch. 22, 3218 (1889).

8. Über Rübeninvertase.

Von Dr. M. Gonnermann (Rostock).

In einer Untersuchung von Stoklasa, Jelinek und Vitek „Über den anaeroben Stoffwechsel der höheren Pflanzen usw.“ (Diese Beiträge 3, Heft 11) findet sich eine Reihe von Angaben über die Invertase in der Zuckerrübe, die geeignet sind, den Eindruck hervorzubringen, daß den Verfassern die Priorität in bezug auf Nachweis und Isolierung dieses Fermentes zukommt. Demgegenüber muß ich folgendes hervorheben:

In der „Vereinsschrift für die deutsche Zuckerindustrie“ (gelbe Hefte) habe ich im Jahre 1898, 48, 667 ff. eine Arbeit veröffentlicht: „Die Entstehung des Zuckers in der Rübe“ und hierbei meine Untersuchungen mit Rübensamen, ganz jungen, etwas älteren — 8 Wochen alten Pflanzen und deren abgetrennten Wurzeln, Blattstielen und Blattflächen — mit reifen Rübenwurzeln, mit Mietenschößlingen sowie mit einer Anzahl anderer Pflanzen genau aufgeführt; ich habe ferner in der „Chem. Ztg.“

1895, Nr. 80 ausführlich die Darstellung eines diastatischen Fermentes aus Zuckerrüben veröffentlicht und die Arbeit ist auch in die „Vereinsschrift“ übergegangen, wobei in der Fußnote Herr Prof. Dr. Herzfeld sagt: . . . . . „Jedoch fehlte es bisher an brauchbaren Vorschriften für Isolierung eines wirksamen Enzyms aus der Rübe. Die Angaben Gonnermanns beanspruchen deshalb Interesse, weil sie eine Darstellungsmethode dafür geben.“

In der oben zitierten Arbeit über die Entstehung des Zuckers usw. habe ich nun 1898 folgende Sätze aufgestellt:

Seite 675: Der Glycerinauszug der Rübenkerne enthält ein invertierendes Enzym;

„ 679: Die Mietenschößlinge enthalten Invertin und Invertzucker;

„ 680: Die grünen Blätter II. Jahrganges enthalten invertierendes Enzym;

„ 686: es findet sich bereits in jungen Blättern erst acht Wochen alter Rübenpflänzchen ein invertierendes und ein diastatisches Enzym;

„ 687: . . . . . die Überführung des Amylums in Saccharose kann nur durch Mitwirkung der Enzyme geschehen;

„ 688: Rübenwurzeln enthalten Invertase und Diastase.

Aus den Versuchen ziehe ich dann S. 689 den Schluß:

„Durch meine Untersuchungen ist die Gegenwart von Invertin und Diastase in den Rüben bestimmt nachgewiesen und ebenso, daß die Enzyme einerseits die Umsetzung des Amylums in Amidulin (Nasse) d. h. lösliche Stärke, Glykose und Saccharose bedingen, anderseits teilweise auch die Grundbedingungen für die Dunkelfärbung der Rübensäfte sind. Die beiden Enzyme, Invertase und Diastase, lassen sich jedenfalls nicht von einander trennen (Zymase?), wir wissen nur, daß sie sicher vorhanden sind. Durch ihre Gegenwart und durch ihr beiderseitiges Zusammenwirken in der chemischen Werkstätte des Pflanzenkörpers entstehen in dem Blattkörper aus dem Amylum hydrolytische Umwandlungsprodukte, welche zum Teil bereits in diesen einzelnen Stationen, andererseits dagegen im Wurzelparenchym sofort in Saccharose übergeführt werden. Daß die in den Rüben befindlichen beiden Enzyme anderer Art sind, als das Invertin der Hefe und die Diastase der Gerste, brauche ich nicht besonders hervorzuheben; auch bei meinen Versuchen über „die Dunkelfärbung der Rüben“ (Zeitschr. 1898, S. 364) ließ ich beide Enzyme auf Tyrosin einwirken und ersah dabei, daß eine Farbenänderung nicht eintrat. Trotzdem möchte ich diesen Rübenenzymen keinen besonderen Namen geben, es genügt, sie mit Rübeninvertase und Rübendiastase zu bezeichnen. Wie diese Enzyme in der Pflanzenzelle wirken, ist wohl außerhalb derselben, im Reagensglas schwer nachzuweisen; ist nun, wie ich bei den mehrfachen Literaturangaben hervorgehoben habe, das Vorhandensein von Enzymen zur Bildung von Saccharose in der Rübe ausnahmslos vorausgesetzt, so ist durch meine vorliegenden Untersuchungen bewiesen, daß die Entstehung des Zuckers nur von der Mitwirkung von Enzymen (Invertase, Diastase) abhängig ist.“

Stoklasa fällt einen, bei 50 bis 350 Atm. Druck erhaltenen Preßsaft mit Alkohol und zieht den Trockenrückstand des Niederschlages mit

Chloroformwasser aus; ich ging von einem Glycerinextrakt aus, welches aus der Trockensubstanz des Alkoholniederschlages gewöhnlichen Preßsaftes oder Diffusionssaftes resultierte, was den Vorteil bietet, daß die Alkoholfällung, wie besonders die Glycerinextraktlösung viel weniger Schleim- und Eiweißkörper enthält. In der Tat war, wie aus den Angaben Stoklasas hervorgeht, mein Präparat viel wirksamer. Wenn ich nun einerseits bedauern muß, daß Herrn Prof. Dr. Stoklasa meine Arbeiten unbekannt geblieben sind, so gereicht es mir doch andererseits zu großer Befriedigung, daß meine vor sechs Jahren gemachten Beobachtungen von fachmännischer Seite eine so wertvolle Bestätigung finden.

XXXVI.

Der Einfluß von Nahrungs- und Blutentziehung auf die Zusammensetzung des Blutplasmas.

Von Dr. Thos. St. Githens (Philadelphia).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

I.

Inanition, Blutverluste und Erkrankungen geben erfahrungsgemäß zu weitgehenden Änderungen in der Zusammensetzung des Blutes Anlaß, die eines völligen Ausgleichs fähig sind. Da diese Veränderungen auch das Plasma betreffen, so folgt daraus, daß neben den geformten Elementen des Blutes auch die Bestandteile des Plasmas einschließlich der Eiweißkörper an dieser Regeneration teilnehmen. Der Tierkörper verfügt somit über Mittel, verloren gegangene bzw. verbrauchte Eiweißstoffe des Plasmas, sei es aus seinem eigenen Eiweißvorrat, sei es durch Neubildung aus dem Eiweiß der Nahrung zu ersetzen. Wie dies geschieht, ist bisher recht wenig untersucht worden, obgleich es sich um einen Vorgang handelt, den man — falls man nicht annehmen will, daß die Plasmaeiweißkörper vom Stoffwechsel ganz unberührt bleiben — als einen innerhalb bestimmter Grenzen schon in der Norm sich vollziehenden auffassen muß.

Der Ersatz der verbrauchten oder verloren gegangenen Plasmaeiweißstoffe kann nun in recht verschiedener Weise zustande kommen. Daß sie in letzter Reihe von dem Eiweiß der Nahrung herstammen, kann nicht bezweifelt werden. Fraglich ist aber die Natur und Zahl der dabei durchlaufenen Zwischenstufen. Gehen die Eiweißkörper des Blutplasmas durch eine in der Schleimhaut des Magendarmtraktes erfolgende Umformung aus dem resorbierten Nahrungseiweiß oder seinen Spaltungsprodukten hervor, oder sind sie Produkte bestimmter Organe, von denen sie mit der Lymphe dem Blute zuströmen? Entstehen ferner die verschiedenen Eiweißkörper des Plasmas, deren Zahl man auf 5 bis 7 veranschlagen kann (Fibrinogen, Euglobulin, ein oder zwei Pseudoglobuline, ein oder zwei Albumine, ein Nucleoalbumin), unabhängig von einander,

oder gehen sie insgesamt oder doch zum Teil aus einer gemeinsamen Muttersubstanz hervor, wie dies durch die interessante Beobachtung von Moll*) über die Entstehung von Pseudo- und Euglobulin aus Albumin durch minimale chemische Einwirkungen nahegelegt wird?

Man ist dieser Frage in der Art näher getreten, daß man untersucht hat, ob Hunger und Blutentziehung einen Einfluß auf die Zusammensetzung des Blutplasmas haben. Da das bisherige Ergebnis dieser Versuche mancherlei Zweifeln Raum ließ, habe ich zur Orientierung über die Sachlage zunächst den gleichen Weg eingeschlagen. Äußere Verhältnisse haben es mir unmöglich gemacht, die Frage über eine vorläufige Untersuchung hinaus zu verfolgen, doch dürfte das Ermittelte für die weitere Bearbeitung, namentlich in betreff der schärferen Fragestellung nicht ohne Wert sein.

II. Methodisches.

Zur Untersuchung diente Blutplasma von Hunden und Kaninchen. Zur Trennung der Eiweißkörper in Fibrinogen, Eu- und Pseudoglobulin- und Albuminfraktion bediente ich mich der fraktionierten Aussalzung mit warm gesättigter Natriumsulfatlösung [Hopkins und Pinkus**), Spiro und Porges***)]. Da die Bestimmung der Eiweißniederschläge durch Auswaschen und Wägen unter den gegebenen Bedingungen große Schwierigkeiten bietet, ermittelte ich ihren Stickstoffgehalt durch Vergleich des Stickstoffgehalts von Ausgangslösung und Filtrat (Simultanfällung von Spiro und Porges). Dieses Verfahren ist nicht bloß bequem, sondern auch, wie ich mich überzeugt habe, für Vergleichsversuche genügend genau.

Bei den einzelnen Versuchen ging ich folgendermaßen vor:

Das Hunden aus der Art. Cruralis, Kaninchen aus der Carotis entnommene Blut floß aus der Glaskanüle unmittelbar in ein Meßgefäß, das eine Normalkochsalzlösung mit 0,2 Proz. Natriumoxalat enthielt. Das Gesamtvolum wurde stets so gewählt, daß das Blut genau auf die Hälfte verdünnt war. Es wurde sofort scharf zentrifugiert, dann das Plasma abgehebert und der Blutkörperchenniederschlag auf Abwesenheit von Fibringerinnseln untersucht. Von dem Plasma wurde eine Probe (a) zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs abgemessen, ferner je eine Probe mit $^1/_4$ Volum (b), mit $^1/_2$ Volum (c) und einem gleichen Volum (d) warm gesättigten Natriumsulfats versetzt. Die Mischung geschah durch Auffüllen in kleinen Maßcylindern. Die gut gemischten Flüssigkeiten wurden in Probiergläschen gegossen, die in Wasser von 37° standen und absitzen

*) Diese Beiträge 4, 563.

**) Journal of Physiology 27, 57 (1901).

***) Diese Beiträge 3, 277.

gelassen. Nach 3 bis 6 Stunden wurde filtriert und ein genau gemessenes Volum zur Stickstoffbestimmung verwendet.

Zur Bestimmung des Extraktivstickstoffs, des „nicht koagulablen Stickstoffs“ wurde das Plasma auf das zehnfache verdünnt, zum Sieden erhitzt, dann mit einigen Tropfen Zinksulfatlösung versetzt. Im Filtrat wurde, falls es absolut frei von Biuretreaktion war, die Stickstoffbestimmung vorgenommen. Ein allzureichlicher Zinksulfatzusatz und Kochen nach Zusatz ist zu vermeiden, da sonst wegen der stark sauren Reaktion Bildung von Acidalbumin erfolgen kann. Allerdings gelingt es auch in diesem Fall durch nachträglichen Zusatz von Natriumkarbonatlösung und nochmaliges Aufkochen die Biuretreaktion zu beseitigen.

Alle Bestimmungen wurden doppelt, und wenn nicht genügende Übereinstimmung erzielt war, drei- und vierfach vorgenommen.

In einigen Versuchen habe ich Kontrollbestimmungen mit viel stärker verdünntem Plasma ausgeführt, doch erhielt ich dieselben Resultate wie mit halbverdünntem*).

Die erhaltenen Zahlen habe ich zunächst auf 100 ccm Blut umgerechnet. Die Differenz von a und b ergab dann den Stickstoff der durch $^1/_3$-Sättigung fällbaren Eiweißfraktion (= Fibrinogenfraktion), ebenso die Differenz von b und c den Stickstoff der Euglobulin-, die von c und d den Stickstoff der Pseudoglobulinfraktion. Der Gesamtstickstoff weniger Gesamtglobulin- und Extraktivstickstoff wurde als Albuminstickstoff in Rechnung gestellt.

Mit der gewählten Bezeichnungsweise — Fibrinogen-, Euglobulin-, Pseudoglobulinfraktion — soll der Entscheidung der bisher nicht allgemein geklärten Frage nach der Zahl der im Blutplasma neben Fibrinogen vorhandenen Globuline nicht vorgegriffen werden. Da ferner die Trennung der Eu- und Pseudoglobulinfraktion unter den gegebenen Verhältnissen recht unvollkommen ist, kann den betreffenden Zahlen nur der Wert einer Orientierung beigemessen werden.

Hervorzuheben ist, daß bei der Fibrinogenbestimmung eine Fehlerquelle gegeben ist, auf die ich erst zum Schluß meiner Arbeit aufmerksam wurde, die aber ebenso gut bei Anwendung anderer Salze an Stelle des von mir benutzten Natriumsulfats und vermutlich auch bei Bestimmung des Fibrinogens aus der Fibrinmenge gegeben ist. In einem Versuche hatte sich im Plasma bei $^1/_3$ Sättigung mit Natriumsulfat nach zweistündigem Stehen im Brutschrank ein nicht unerheblicher Niederschlag abgesetzt, der dann aber bei weiterem dreistündigem Stehen in der Wärme wieder verschwand. Es kann sich kaum um etwas anderes als eine „Fibrinolyse“ gehandelt haben, die wie Morawitz**) gesehen hat, auch beim Fibrinogen, wenn auch nur ausnahmsweise zu beobachten ist, die übrigens, soweit es sich um Fibrin handelt, auch in Salzlösung und bei niederer Temperatur eintreten kann (Dastre). Ihr Auftreten müßte die Fibrinogenzahl herabsetzen, die Albuminzahl erhöhen, und es wäre nicht undenkbar, daß die hin und wieder von Lewinski***) und mir beobachteten großen Schwankungen im Fibrinogengehalt des Hundebluts

*) Wallerstein (Diss. Straßburg 1902) fand, daß bei seinem Kaliumacetatverfahren die erhaltenen Eiweißwerte mit steigender Verdünnung abnahmen.

**) Diese Beiträge 4, 391.

***) Pflügers Archiv 100, 611.

zum Teil auf ein Übersehen dieses Umstandes zu beziehen sind. Durch rasches Arbeiten könnte man wohl diese Fehlerquelle unschädlich machen. Da jedoch eine Fibrinolyse von störendem Umfang nur eine Ausnahmeerscheinung ist, so habe ich zunächst keinen Grund anzunehmen, daß sie meine Zahlen beeinflußt hat.

In den mitzuteilenden Versuchstabellen habe ich die für die einzelnen Eiweißfraktionen ermittelten Werte in Prozenten des Gesamteiweißstickstoffs des Plasmas von 100 ccm Blut ausgedrückt, da einerseits die direkt ermittelten Stickstoffzahlen sich wegen Unkenntnis des Volums der abzentrifugierten Blutkörperchen nicht auf ein bestimmtes Plasmavolum umrechnen lassen, andererseits bei Prozentberechnung das gegenseitige Mengenverhältnis der einzelnen Fraktionen, worauf es hier hauptsächlich ankommt, besser hervortritt.

III. Einfluß der Nahrungsentziehung.

Die Versuche von A. E. Burckhardt*) haben seinerzeit zu dem Ergebnis geführt, daß bei Hunden die Inanition den Gehalt des Blutes an aus dem Serum durch Dialyse fällbarem Globulin — das der Hauptmasse nach dem Euglobulin entspricht — im Verhältnis zum Gesamteiweiß eine Steigerung erfährt. S. Wallerstein**) hat im hiesigen Laboratorium bei Kaninchen im Gefolge der Nahrungsentziehung im Serum eine Zunahme des Gesamtglobulins (in diesem Fall Fibrino- + Eu- + Pseudoglobulin) beobachtet. Jüngster Zeit hat Lewinski***) in einer an 4 Hunden durchgeführten Versuchsreihe ebenfalls eine Steigerung des Globulingehalts nach dem Hungern auftreten sehen†).

Meine Versuche hatten zum Ziel, die von Wallerstein am Kaninchen begonnenen Versuche am Hunde fortzuführen, wo wegen der Möglichkeit, größere Blutmengen zu entziehen, anscheinend günstigere Versuchsbedingungen gegeben waren. Leider ist dies, wie ich in Bestätigung einer Angabe von Lewinski hervorheben muß, in anderer Richtung nicht der Fall, insofern nämlich beim Hund die normalen Schwankungen im Fibrinogen- und im Gesamtglobulin-Gehalt sehr große sind.

Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, nur die am selben Tiere ermittelten Werte untereinander zu vergleichen, und, da es danach unvermeidlich ist, am selben Tier eine ganze Reihe Aderlässe auszuführen, die Menge des von einem Aderlaß ent-

*) Archiv f. experim. Pathol. u. Pharm. **16**, 322.

**) Dissertation. Straßburg 1902.

***) a. a. O.

†) Meine einschlägigen Versuche waren abgeschlossen, als Lewinskis Mitteilung erschien.

nommenen Blutes möglichst einzuschränken. Man liefe sonst Gefahr, die Wirkung der Inanition mit jener von gehäuften Blutverlusten zu komplizieren.

Die Ernährung wurde so geleitet, daß die Tiere zunächst mit einer nicht zu reichlichen Ration Pferdefleisch annähernd in Stickstoff-Gleichgewicht gebracht wurden; im Beginne jeder Hungerperiode wurden 2 oder 3 Tage völliger Abstinenz eingeschaltet, an den übrigen Tagen der Hungerperiode wurde die halbe Ration des früher zur Erreichung des Gleichgewichts benötigten Fleisches gereicht. Während der „Fütterungsperioden" stand den Tieren Pferdefleisch oder Brot in unbeschränkter Menge zur Verfügung.

Die Ergebnisse sind folgende:

Versuch I.

Hund, 10 Kilo schwer.

	normal	nach 2 Wochen Hunger	nach weiteren 3 Wochen Hunger	nach 2 wöchentlicher Fleischfütterung
Gesamteiweiß-N des Plasmas von 100 ccm Blut	0,784 g	0,702 g	0,946 g	0,868 g
Fibrinogen und Euglobulin (in Proz. des Gesamteiweiß-N)	18 } 44	41,5 } 56,5	32,5 } 59	38 } 59
Pseudoglobulin (in Proz. des Gesamteiweiß-N)	26	15	26,5	21
Albumin (in Proz. des Gesamteiweiß-N)	56	43,5	41	41

Versuch II.

Hund, 8 Kilo schwer.

		nach 3 Wochen Hunger	nach 2 Wochen Brotfütterung
Fibrinogen und Euglobulin	in Proz. des Gesamteiweiß-N	26	23,5
Pseudoglobulin	in Proz. des Gesamteiweiß-N	24	7,5
Albumin	in Proz. des Gesamteiweiß-N	50	69

Versuch III.

Hund, 13 Kilo schwer.

		nach 1 Woche Hunger	nach 3 Wochen Hunger	nach 2 Wochen Brotfütterung
Fibrinogen und Euglobulin	in Proz. des Gesamteiweiß-N	45 } 67	52 } 66	21 } 34
Pseudoglobulin	in Proz. des Gesamteiweiß-N	22	14	13
Albumin	in Proz. des Gesamteiweiß-N	33	34	66

Das Ergebnis der Versuche lehrt in Übereinstimmung mit Burckhardt, Wallerstein und Lewinski, daß bei ungenügender Ernährung in der Regel der Globulinanteil der Plasmaeiweißkörper relativ zunimmt. Die Vermehrung der Globuline im Hunger betrifft vorzugsweise die Fibrinogen- + Euglobulinfraktion, was mit der Beobachtung Burckhardts in Einklang steht. In meinen Versuchen hatte überdies in Versuch II und III die reichliche Brotzufuhr eine rasche Rückkehr zur Norm (Überwiegen des Albumins) zur Folge. In Versuch I hatte aber reichliche Fleischzufuhr nicht den gleichen Erfolg. Ob es sich bei dieser Verschiedenheit um eine regelmäßige Erscheinung handelt, ist vorläufig nicht zu entscheiden.

Eine sichere Deutung der nunmehr von mehreren Seiten sichergestellten Globulinvermehrung im Hunger ist wohl noch nicht gegeben. Burckhardt hat auf die Abstammung des Globulins aus den Organen hingedeutet. Da diese in ihrem Protoplasma in der Tat globulinartige Eiweißkörper, aber keine Albumine oder doch nur in spärlicher Menge zu enthalten pflegen, so hat diese Deutung manches für sich. Das Albumin stünde nach dieser Auffassung dem Eiweiß der Nahrung genetisch näher — daher die Abnahme bei verminderter Nahrungszufuhr. Auch die Vorstellung, daß das zunächst dem Blute zugeführte Albumin darin durch einen Vorgang, der der Einwirkung minimaler Alkalimengen (Moll) entspräche, allmählich in Globuline übergehe, sodaß bei mangelndem Albuminnachschub die Globuline das Übergewicht erhielten, ließe sich mit diesem Befunde in Einklang bringen.

Für eine Abhängigkeit der beobachteten Globulinschwankungen von der Nahrungszufuhr spricht auch die beim Hunde beobachtete Inkonstanz der Zusammensetzung des Plasmas, und es ist nicht ausgeschlossen, daß hier die Art der Nahrungszufuhr oder andere wechselnde Bedingungen einen bedeutenden Einfluß ausüben. Hierüber sollen weitere Untersuchungen Aufklärung bringen.

IV. Einfluß von Blutentziehungen.

Versuche in dieser Richtung hat bereits Burckhardt*) an drei Hunden unternommen, ohne jedoch ein eindeutiges Resultat zu erzielen. Ich habe auf die Wiederholung ausgiebiger Blutentziehungen bei gleichzeitiger guter Ernährung das Hauptgewicht gelegt.

Die Versuchsanordnung war die gleiche wie in der vorigen Versuchsreihe. Nur ergab sich eine Tatsache, die eine kleine methodische Änderung nahelegte. Es zeigte sich in einem Falle, daß das Hundeplasma bei Wiederholung der Aderlässe in größeren Zwischenräumen eine trübere,

*) a. a. O.

mehr milchige Beschaffenheit annahm, und daß sich aus ihm direkt oder auch nach weiterem Verdünnen mit Kochsalzlösung durch Essigsäure ein Eiweißkörper ausfällen ließ, der sich als phosphorreich und als in überschüssiger verdünnter Essigsäure und in Kochsalzlösung unlöslich, wohl aber in Alkali löslich erwies. Es lag, nach dem ganzen Verhalten zu schließen, das Nucleoproteid des Blutserums*) vor, anscheinend in übernormaler Menge. Da dieses Nucleoproteid bei der Salzfällung fast ganz in die erste Fraktion überzugehen pflegt, habe ich es in den späteren Versuchen durch Säurefällung gesondert bestimmt und den gefundenen Wert bei der Fibrinogenfraktion in Abzug gebracht.

Versuch IV.

Hund, 7,2 Kilo schwer.

		a	b	c	d	e
Datum der Blutentziehung . .		23. XI.	26. XI.	30. XI.	7. XII.	14. XII.
Entnommene Blutmenge . ccm		145	72	80	108	75
Gesamteiweiß-N des Plasmas von 100 ccm Blut . . . g		1,162	1,098	0,947	0,810	0,767
Fibrinogen (+Nucleoproteid)	in Proz. des Gesamteiweiß-N	17,7	10,7	9	(16)	(13,7)
Euglobulin . . .	in Proz. des Gesamteiweiß-N	8,2	12,3	19	24	17,3
Pseudoglobulin .	in Proz. des Gesamteiweiß-N	48,5	28	14,5	20	22,4
Albumin	in Proz. des Gesamteiweiß-N	25,6	49	57,5	40	46,6

In diesem Versuche wurde die obenerwähnte Beobachtung gemacht, daß nach wiederholten Blutverlusten die Menge des Nucleinkörpers erheblich gesteigert ist. Da er bei größerem Gehalt daran zum großen Teil in die erste Salzfraktion übergeht, so sind die für das Fibrinogen gefundenen Werte, namentlich die bei den letzten Blutentziehungen erhaltenen, zu hoch und müssen bei Beurteilung des Verhaltens des Fibrinogens außer Betracht bleiben.

Versuch V.

Hund. 7,8 Kilo schwer.

		a	b	c	d
Datum der Blutentziehung . .		17. II.	22. II.	24. II.	26. II.
Entnommene Blutmenge . ccm		150	75	75	75
Gesamteiweiß-N des Plasmas von 100 ccm Blut . . . g		0,676	0,824	0,861	0,764
Nucleinkörper . .	in Proz. des Gesamteiweiß-N	5,5	9	9,7	7
Fibrinogen . . .	in Proz. des Gesamteiweiß-N	2,4	14	7,3	6
Euglobulin . . .	in Proz. des Gesamteiweiß-N	13,5	12	12,7	11
Pseudoglobulin .	in Proz. des Gesamteiweiß-N	19,3	21	21,5	20
Albumin	in Proz. des Gesamteiweiß-N	59,3	44	48,8	56

*) Über Isolierung und Eigenschaften dieses Nucleinkörpers hat Herr Dr. Pascucci im hiesigen Laboratorium Untersuchungen ausgeführt, über

In diesem Fall wurde der erste Aderlaß (vom 17. II.) sofort nach Einbringen des Tieres ins Institut vorgenommen. Obgleich das Tier kein Zeichen einer Erkrankung darbot, wich die Zusammensetzung der ersten Blutprobe, wie aus dem geringen Eiweiß- und Fibrinogengehalt des Plasmas hervorgeht, weit von der Norm ab. Dazu kommt, daß das Plasma von vorneherein stark weißlich trübe war und mit verdünnter Säure direkt einen Niederschlag des Nucleinkörpers gab. Das Blut des 5 Tage später vorgenommenen Aderlasses steht der Norm näher. Es sind daher nur die bei dem 2. bis 4. Aderlaß erhaltenen Werte unter sich vergleichbar.

Versuch VI.

Kaninchen, 1,5 Kilo schwer.

		a	b	c	d
Datum der Blutentziehung . .		5. II.	9. II.	15. II.	19. II.
Entnommene Blutmenge . ccm		30	30	30	30
Gesamteiweiß-N in 100 ccm Plasma . . . . g		1,048	0,789	0,737	0,767
Fibrinogen . . .	in Proz. des Gesamteiweiß-N	13	10,5	10	8,7
Euglobulin . . .	in Proz. des Gesamteiweiß-N	16	7,5	11,5	11,5
Pseudoglobulin .	in Proz. des Gesamteiweiß-N	11	18	14,5	18,3
Albumin	in Proz. des Gesamteiweiß-N	60	64	64	61,5

Trotz der geringen Zahl der Versuche lassen die mitgeteilten Zahlen ein Verhalten erkennen, das einer weiteren Untersuchung wert ist. In allen Fällen ist nämlich eine Verminderung des Fibrinogengehalts mit der Zahl der Aderlässe nachweisbar. Auch die in Versuch IV d und e in Klammer angeführten Zahlen der letzten Aderlässe fügen sich dieser Regel, wenn man die bei diesen Teilversuchen ermittelten Stickstoffmengen des Nucleoproteids (es wurden 0,05 bzw. 0,077 N pro 100 ccm Blut gefunden) in Abzug bringt. Ferner fällt bei den zwei an Hunden ausgeführten Versuchen auf, daß bei rascher Aufeinanderfolge der Blutentziehungen (Versuch IV a, b, c, Versuch V b, c, d) der relative Albumingehalt auffällig ansteigt. Die Regelmäßigkeit der Erscheinung spricht dagegen, daß es sich um einen Zufall handelt.

Diese Befunde, die mit Rücksicht auf die kleine Statistik nur eine vorläufige Deutung gestatten, lassen sich am besten mit der Vorstellung in Einklang bringen, daß das Fibrinogen vom Organismus

die demnächst berichtet werden soll. Vermutlich handelt es sich um denselben Körper, den Freund und Joachim, ohne ihn übrigens isoliert zu haben (Zeitschr. f. physiol. Chemie 36, 407), als Nucleoglobulin bezeichnen.

viel schwerer ersetzt wird, als die übrigen Eiweißstoffe des Plasmas, vor allem als das Albumin, das hier wie in den Hungerversuchen sich so verhält, als wenn es dem Nahrungseiweiß am nächsten stände. Jedenfalls muß man danach vermuten, daß Albumin und Fibrinogen aus verschiedener Quelle stammen. Das Verhalten der Serumglobuline läßt eine Schlußfolgerung nicht zu, widerspricht aber wenigstens nicht der Annahme, daß sie aus dem Albumin, sei es im Blute selbst, sei es außerhalb, hervorgehen.

XXXVII.

Bemerkungen zu dem Aufsatze Oswalds „Untersuchungen über das Harneiweiß“.

Von **K. A. H. Mörner** (Stockholm).

Vor einiger Zeit hat A. Oswald*) eine Abhandlung unter dem oben angegebenen Titel veröffentlicht. Fragen, die ich schon vor etwa 10 Jahren eingehend bearbeitet habe**), werden von Oswald in einer Weise besprochen, daß ich mich zur Abgabe der nachstehenden Bemerkungen genötigt sehe. Oswald kommt nämlich zu dem Schlusse, daß die Eiweiß enthaltende Fällung, welche Essigsäure in Menschenharn bewirken kann, aus einem Globulin (Euglobulin) bestehe. Dieser Schluß ist aber nicht hinreichend begründet, da er nur auf die Löslichkeit bzw. Fällbarkeit der Eiweißsubstanz gebaut ist. Schon Oswalds eigene Angaben können Zweifel darüber erregen, ob es mit diesem „Euglobulin“ ganz richtig bestellt sei. Seite 239 sagt er nämlich, daß in der Auflösung des salzfreien (aus dem Harne dargestellten) Globulins der Zusatz von wenigen Tropfen verdünnter Essigsäure einen flockigen Niederschlag hervorrief; andererseits sagt Oswald (S. 242), daß es im Blute wesentlich der Salzmangel sei, der das Ausfällen des Euglobulins und des Fibrinogens durch Essigsäure verhindere, in welcher Aussage er sich an Matsumoto anlehnt. Schon dieser Gegensatz der Angaben kann wohl Bedenken erregen. Noch fraglicher wird die Anschauung Oswalds durch meine Erfahrung über die Natur der Fällung, welche aus normalem oder schwach eiweißhaltigem Harn durch Zusatz von Essigsäure erhalten werden kann. Durch eingehende Unter-

---

*) A. Oswald, Diese Beiträge 5, 234 (1904).

**) K. A. H. Mörner, Skandin. Archiv f. Physiol. 6, 332 bis 437 (1895)

suchungen, wobei ich mich nicht mit der Prüfung der Löslichkeit und Fällbarkeit begnügte, fand ich, daß dieser Niederschlag nicht aus freiem Eiweiß, sondern aus Eiweißverbindungen besteht. Die Löslichkeit und Fällbarkeit des Eiweißes selbst treten nicht hervor; die Eigenschaften der Verbindungen sind in dieser Hinsicht ganz andere. Die einseitige Prüfung der Löslichkeit und Fällbarkeit gibt also wenig Auskunft und kann sogar ganz irreleitend wirken. Zur Ermittelung der wahren Natur dieser Eiweißverbindungen, zum Studium des darin enthaltenen Eiweißes und der damit verbundenen Substanzen, die ich als „eiweißfällende Substanzen“ bezeichnet habe, müssen mehr eingehende Untersuchungen herangezogen werden.

Meine jetzt erwähnten Untersuchungen sind zum Teil von anderen Forschern bestätigt worden, und viele Verfasser mit Autorität auf diesem Gebiete haben sie aufgenommen und gewürdigt. Aus diesem Grunde habe ich mich dessen enthalten können, in dieser Frage aufzutreten, obgleich mehrere Arbeiten über das Eiweiß des Harnes erschienen sind, worin meine Untersuchungen nicht hinreichend berücksichtigt wurden, Arbeiten, deren Schlußfolgerungen deshalb oft sehr anfechtbar sind. In dem vorliegenden Falle kann ich aber nicht schweigen, da ich direkt angegriffen bin. Oswald sagt nämlich (S. 237): „Auf den Mörnerschen Einwand, wonach der durch Essigsäure fällbare Körper möglicherweise nichts anderes sei, als eine Verbindung von Chondroïtinschwefelsäure, bzw. Nucleinsäure oder Gallensäure mit Serumalbumin, brauche ich nicht einzugehen, da er von Stähelin*) schon zurückgewiesen wurde“.

Gegen diesen Ausspruch muß ich anführen, daß ich die Bildung solcher Eiweißverbindungen nicht nur als etwas „möglicherweise“ vorkommendes angegeben, sondern sie sogar direkt nachgewiesen habe. Die wichtigste unter den mit dem Eiweiß verbundenen, sogen. „eiweißfällenden“ Substanzen, die Chondroïtinschwefelsäure, habe ich sogar aus dem Niederschlage isolieren und so weit reinigen können, daß ihre Identität unmittelbar geprüft werden konnte. Die Untersuchungen über die anderen Substanzen konnten so weit geführt werden, daß meine Schlußfolgerungen, meines Wissens, bisher nie erschüttert worden sind und meines Erachtens kaum erschüttert werden können.

Der Ausspruch Oswalds kann wohl darin seine Erklärung finden, daß er meine Arbeit nicht näher kennen gelernt hat. Diese Annahme scheint mir dadurch gestützt zu werden, daß er meine Arbeit nicht direkt

*) Stähelin, Münch. med. Wochenschr. Nr. 34, 1902.

zitiert, sondern nach Stähelin anführt. Darum scheint auch Oswald entgangen zu sein, daß Stähelin sich nicht so abweisend gegen dieselbe stellt wie Oswald angibt. Ich kann nämlich nicht finden, daß Stähelin meine Untersuchung bestritten, geschweige denn zurückgewiesen hat. Auf der letzten Seite sagt er: „Es muß also ein durch Essigsäure fällbarer Eiweißkörper vorhanden sein, der nicht dem von Mörner nachgewiesenen entspricht". Dies kann wohl nicht eine Zurückweisung meiner Untersuchungen genannt werden. Eher werden wohl die positiven Ergebnisse derselben von Stähelin als richtig anerkannt, nur daß sie, seiner Meinung nach, nicht alle Möglichkeiten umfassen. Übrigens konnte Stähelin meine Untersuchungen nicht bestreiten, da sie sich hauptsächlich auf normalen und schwach eiweißhaltigen Harn beziehen, während Stähelin ikterischen Harn bearbeitet hat. Daß er bei der Bearbeitung der Essigsäurefällung aus diesem Harn weder die Bildung einer reduzierenden Substanz noch die Abspaltung von Schwefelsäure bei der Digestion mit Salzsäure (Zeichen der Gegenwart von Chondroïtinschwefelsäure) beobachten konnte, bedeutet nichts, da zu erwarten war, daß der Niederschlag in diesem Falle aus Gallensäureverbindungen bestände und da er übrigens nur mit geringen Mengen gearbeitet zu haben scheint, weil er von Mangel an Material spricht. Hinsichtlich der Gegenwart von Gallensäuren in der Fällung aus ikterischem Harne sind aber unsere Angaben strittig. Dies ist indes leicht zu erklären. Aus der, bei der Gegenwart von Eiweiß reichlichen Fällung, welche durch Zusatz von Essigsäure im ikterischen Harn bewirkt werden kann, habe ich Gallensäuren ausziehen und direkt nachweisen können. Stähelin verneint die Gegenwart von Gallensäuren in dieser Fällung, aber er hat auch nie nach solchen Säuren gesucht. Seine Anschauung gründet sich nur auf eine unbewiesene Annahme. Er glaubt nämlich, daß die durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat erzeugte Fällung keine Gallensäuren enthalten könne, und im Filtrate bekam er beim Zusatze von Essigsäure nur eine geringe Trübung. Freilich wurde auch die wässerige Lösung der erwähnten Ammoniumsulfatfällung durch Essigsäure gefällt. Er hält sie jedoch für frei von Gallensäuren, „da ja", wie er sagt, „Gallensäuren durch Ammoniumsulfat nicht freigemacht werden und nicht auf das Eiweiß einwirken können, sondern in Lösung bleiben". Hierzu ist erstens zu bemerken, daß Stähelin unterlassen hat, das Verhalten der gallensauren Alkalien zu prüfen. Nach S. Tengström*) geben 2proz. wässerige Lösungen sowohl des Glykocholats wie des Taurocholats beginnende Fällung schon bei dem Zusatze von 3 Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung zu 5 Volumen der Gallensalzlösung; Stähelin hat aber den Harn mit einer noch größeren Menge, nämlich mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt; die Aussalzung von gallensaurem Salz ist also gewiß nicht ausgeschlossen. Zweitens ist Stähelins Annahme auch aus anderen Gründen unberechtigt. Auch wenn der Harn neutralisiert worden war, was nicht besonders angegeben wird, ist wohl seine Annahme kaum mit unserer jetzigen Kenntnis über die hydrolytische Dissoziation der Salze von schwachen Säuren zu vereinbaren. Stähelins willkürliche und kaum annehmbare Voraussetzung kann wohl kein Beweis gegen meine Erfahrung sein, da ich die Gegenwart von Gallensäuren direkt

*) S. Tengström: Zeitschr. f. physiol. Chemie. 41, 218 (1904).

nachgewiesen habe, während Stähelin nicht einmal darauf geprüft hat. Die Aussage Oswalds ist also auch in dieser Hinsicht unberechtigt.

Daß ich, um mich zu verteidigen, in diesem Punkte gegen Stähelin auftreten mußte, ist gegen meinen Willen geschehen, da Stähelin selbst sagt, daß seine Harnuntersuchungen nicht zu Ende geführt worden sind.

Die Abhandlung Oswalds leidet an der Einseitigkeit, daß er, ohne eingehendere Untersuchungen auszuführen, durch Prüfung der Löslichkeit und Fällbarkeit der bearbeiteten Substanzen die Natur des darin enthaltenen Eiweißes feststellen will. In so einfacher Weise gelingt aber diese Feststellung nicht immer, Ich glaube, daß es in diesem Falle sehr nützlich gewesen wäre. wenn Oswald bei der Beurteilung seiner Beobachtungen die Erfahrungen herangezogen hätte, welche ich über die Natur der durch Essigsäure bewirkten eiweißhaltigen Fällung aus dem Harn mitgeteilt habe; vielleicht wären dann seine Schlußfolgerungen anders ausgefallen.

Ich kann meine umfangreiche Abhandlung hier nicht wiederholen und muß mich daher begnügen, an einigen Beispielen zu zeigen, wie wenig beweiskräftig, ja sogar irreführend solche Schlußfolgerungen sein können, wenn man die Verhältnisse der Löslichkeit und Fällbarkeit bei der Beurteilung der Natur einer eiweißhaltigen Substanz als allein entscheidend betrachtet.

1. Wenn man, wie ich in meiner Abhandlung näher angegeben habe (S. 364 bis 402) normalen Harn oder Harn, der etwas mehr Eiweiß als normal enthält, dialysiert, mit Essigsäure bis 0,2 Proz. ansäuert, Chloroform zusetzt und oft schüttelt, so entsteht nach einigen Tagen ein Niederschlag. Manchmal kann dieser Niederschlag schon bei dem Zusatz der Essigsäure entstehen. Im Filtrate bewirkt Zusatz von Serumalbumin oft eine neue Fällung. wenn nämlich die „eiweißfällenden Substanzen" im Überschuß zugegen sind, was normalerweise der Fall ist.

Die näheren Untersuchungen, welche ich in meiner Abhandlung mitgeteilt habe, zeigen, daß diese beiden Fällungen mit einander übereinstimmen. Diese Fällungen sind mit dem Essigsäureniederschlage Oswalds zu vergleichen, welchen er als „Euglobulin" betrachtet. Daß der durch Zusatz von Serumalbumin erhaltene Niederschlag Serumalbumin enthält, kann nicht bezweifelt werden, obgleich das Verhalten desselben gegen Säuren und Salze usw. ein ganz anderes ist als dasjenige des freien Albumins selbst, weil es an die „eiweißfällenden Substanzen" gebunden ist.

2. Ein anderes Beispiel, welches ebenfalls auf die Abhandlung Oswalds nahe Beziehung hat, findet sich in meiner erwähnten Abhandlung (S. 411 Fußnote) kurz erwähnt.

Normaler Menschenharn wurde möglichst genau neutralisiert (Lackmus). Eine Lösung von Serumalbumin (aus Ascitesflüssigkeit isoliert), welche bei der Sättigung mit Magnesiumsulfat bei 30 bis 35° C keine Trübung gab, wurde dem Harne zugesetzt. Dann wurde mit Magnesiumsulfat bei der erwähnten Temperatur gesättigt. Bei einem Gehalte von 0,06 Proz. Serumalbumin wurde das Eiweiß gänzlich aus dem Harn gefällt, selbstverständlich in der Form von Verbindungen mit den „eiweißfällenden Substanzen". In einem anderen Versuche (0,17 Proz. Serumalbumin) wurde der größere Teil des Eiweißes ausgefällt. In einem ähnlichen Versuche mit dem Harn nach Phosphorvergiftung (es bestand Icterus) wurde bei einem Gehalte von 0,35 Proz. Serumalbumin alles Eiweiß in dieser Weise ausgefällt, und sogar bei einem Gehalte von 0,55 Proz. Serumalbumin blieb nur eine geringe Menge des Eiweißes in der Lösung.

Daß die Versuche, Globulin im Harn durch Sättigen mit Magnesiumsulfat nachzuweisen oder zu bestimmen, nach dieser Erfahrung eine nur geringe oder sehr beschränkte Bedeutung haben, ist selbstverständlich. Das Albumin kann ja nicht in Globulin verändert worden sein.

Auch bei Vergleichsversuchen mit Halbsättigung des Harns durch Ammoniumsulfat wurde das Albumin gefällt, aber weniger vollständig als durch Sättigen mit Magnesiumsulfat. Vielleicht hängt dies mit einem verschiedenen Verhalten der beiden Salze gegen die Phosphate des Harns zusammen.

Da Oswald nicht beachtet hat, daß solche Eiweißverbindungen im Harne entstehen, und da die Zerlegung dieser Verbindungen in ihre Komponenten nicht leicht gelingt, bleibt es unentschieden, wie viel von Oswalds sogen. „Euglobulin" aus dergleichen Eiweißverbindungen bestand; daß solche darin vorkamen, kann als sicher angesehen werden: ob daneben freies Globulin vorkam, ist durch Oswalds Untersuchung nicht entschieden worden.

3. Ein anderer einfacher Weg, die Fällbarkeitsveränderung des Serumalbumins zu zeigen, welche durch die Bildung von Verbindungen mit den „eiweißfällenden Substanzen" des Harns (im gewöhnlichen Harn hauptsächlich Chondroitinschwefelsäure) bewirkt werden kann, ist die Anstellung des folgenden Versuches, welchen ich seit mehreren Jahren in meinen Vorlesungen vorzu-

führen pflege, und der deshalb instruktiv ist, weil er Verhältnisse erklärt, denen man bei der klinischen Untersuchung des Harns auf Eiweiß nach Heller begegnet.

Zu mehreren Proben von normalem Menschenharn, der bei dem vorsichtigen Eingießen von Salpetersäure unter den Harn gar keine Trübung entstehen läßt, werden verschiedene Mengen einer mit demselben Harn bereiteten Auflösung von Albumin hinzugesetzt, so daß man eine Serie von Eiweißharnen bekommt, deren Eiweißgehalt 1 : 500 bis 1 : 30000 ist. Ich benutze zu diesem Versuche mit Vorliebe ein nach dem Fällen des Globulins usw. durch Sättigen mit Magnesiumsulfat aus stark eiweißhaltigem Harn isoliertes Albumin. Die Harnproben werden nach Heller auf Eiweiß geprüft, indem Salpetersäure (25 Proz.) mittels einer Pipette vorsichtig unter den Harn eingeführt wird (nicht Schichten des Harns auf die Salpetersäure). Der ursprüngliche Harn gibt dabei keine Trübung. Eine Wasserlösung des Albumins gibt bei einer solchen Untersuchung nur die typische Trübung dicht oberhalb der Salpetersäure. In den eiweißhaltigen Harnen kann man etwas anderes zu sehen bekommen. Die Erscheinungen können je nach der Konzentration des Harnes, nach dem Gehalte desselben an „eiweißfällenden Substanzen“, nach der Natur des zugesetzten Albumins und nach vielleicht noch anderen Umständen etwas verschieden ausfallen. Wenn der Versuch gelungen ist, kann man in einer Serie das Folgende beobachten: dicht oberhalb der Säure sieht man den typischen Niederschlag des Eiweißes, den „Eiweißring“, welcher in den eiweißärmsten Harnproben schwach oder vielleicht kaum deutlich ist; in mehreren der Proben sieht man einige bis mehrere Millimeter darüber eine andere Trübung, einen „oberen Ring“; dieser Ring ist bei mittlerem Eiweißgehalt etwa ebenso stark wie der typische Eiweißring; in den eiweißärmsten Proben ist er oft beträchtlich stärker als dieser, oder scheint sogar allein aufzutreten, wenn der typische Eiweißring ganz schwach ist; in den eiweißreichsten Harnproben ist dieser „obere Ring“ verhältnismäßig schwach, oder kann ganz ausbleiben; wenn die Harnproben mit Wasser verdünnt werden, tritt dieser „obere Ring“ bisweilen deutlicher hervor.

Die Erklärung dieser Erscheinungen, welche ich nach der in meiner oben zitierten Abhandlung niedergelegten Erfahrung über die durch Essigsäure aus dem Harn fällbare Eiweißsubstanz geben kann, ist die folgende:

Der „obere Ring“, welcher weder von dem Harn selbst, noch von der Eiweißlösung selbst gegeben wird, entsteht dadurch, daß

das zugesetzte Eiweiß mit den sogen. „eiweißfällenden Substanzen" des Harns (in normalem Harn hauptsächlich Chondroïtinschwefelsäure) Verbindungen eingeht. Durch eine ganz geringe Menge Salpetersäure werden sie gefällt; dieser Niederschlag bildet „den oberen Ring". Die Eiweißverbindungen sind in einer etwas stärkeren Säure löslich; deswegen findet sich unterhalb dieser Trübung eine klare oder verhältnismäßig wenig getrübte Schicht. Bei einer noch größeren Konzentration der Säure findet die bei der Hellerschen Probe als typisch angesehene Eiweißfällung statt. Das Eiweiß ist bekanntlich mehrwertig und kann daher mit der Chondroïtinschwefelsäure mehrere verschiedene Verbindungen eingehen. Ich will die Eigenschaften dieser Verbindungen dahin zusammenfassen, daß, je reicher sie an der Säure sind, sie sich (selbstverständlich innerhalb gewisser Grenzen) um so mehr in Löslichkeit und Fällbarkeit von dem Eiweiße unterscheiden. Je reicher dagegen sie an Eiweiß sind, um so mehr sind die Löslichkeits- und Fällbarkeits-Verhältnisse des Eiweißes selbst vorherrschend.

In den oben beschriebenen Versuchen wird derselbe Harn zu allen Versuchen verwendet. Bei geringem Eiweißgehalt sind also die „eiweißfällenden Substanzen" verhältnismäßig reichlich vorhanden und machen sich mehr geltend. Bei dem Zusatz von viel Eiweiß werden die im Harn gebildeten Eiweißverbindungen arm an „eiweißfällender Substanz"; die Einwirkung derselben wird daher weniger bemerkbar, oder kann ganz ausbleiben.

Es ist eine alte, bis zu Reißner (1862. Vergl. meine Abhandlung S. 431) zurückgehende Erfahrung, daß eine mucinähnliche Substanz (dem erwähnten „oberen Ring" entsprechend) oft bei beginnender Albuminurie auftritt, später auf dem Höhestadium der Krankheit vielleicht verschwinden kann, um bei Zurückgehen der Albuminurie länger als die Reaktion des typischen Eiweißes zu bestehen. Nach der oben gegebenen Darlegung kann dies durch Unterschiede des Eiweißgehaltes des Harns im Anfang, im Höhestadium und am Ende der Albuminurie erklärt werden. Eine andere Möglichkeit ist auch zu beachten, diejenige nämlich, daß der Gehalt an „eiweißfällenden Substanzen" variieren kann. Diese Frage zu entscheiden bietet große Schwierigkeiten dar, und eine hinreichende Erfahrung darüber liegt noch nicht vor. Nach eigener Erfahrung und nach Angaben, welche von anderen in der Literatur niedergelegt sind, finde ich es aber wahrscheinlich, daß die Menge der „eiweißfällenden Substanzen" bisweilen bei der Schrumpfniere vermindert ist; ich habe sogar

den Eindruck bekommen, daß dabei das Auftreten der „typischen" Reaktion nach Heller bisweilen eher durch diesen Umstand als durch die Erhöhung der Eiweißmenge zu erklären sei. Ich halte es nicht für unwahrscheinlich, daß etwas ähnliches auch bei anderen Zuständen vorkommen kann.

Bei der Eiweißprobe nach Heller deutet also auch „der obere Ring" auf die Gegenwart von Eiweiß. Daß die angeführte Substanz kein Mucin ist, geht schon aus dem oben Gesagten hervor, und wird durch die eingehende Untersuchung, welche ich in meiner oben zitierten Abhandlung niedergelegt habe, ausführlich begründet.

Daß der „obere Ring" unter den oben angegebenen Bedingungen nicht durch eine Ausscheidung von Uraten erklärt werden kann, ist selbstverständlich. In den Handbüchern findet man immer noch bei der Beschreibung der Hellerschen Probe einen „Uratring" erwähnt. Die Beschreibung derselben paßt auf den jetzt beschriebenen „oberen Eiweißring". Ich bin der Meinung, daß diese Erscheinung in den allermeisten Fällen, wo sie auftritt, die Gegenwart von Eiweiß anzeigt. Bei Versuchen mit Harnsäure habe ich mich von der Bildung eines Uratringes, welcher mit der angeführten Beschreibung übereinstimmte, nicht überzeugen können. Bei dem Zusatze von viel Harnsäure tritt die Ausscheidung dicht oberhalb der Salpetersäure auf. Bei geringeren Mengen von Harnsäure finde ich eine diffuse Trübung, welche dicht oberhalb der Salpetersäure beginnt und sich nach oben fortsetzt; bisweilen kann man in dieser Trübung kleine Kristalle sehen. Eine begrenzte Trübung und darunter, zwischen dieser und der Salpetersäure, eine klare oder nur wenig getrübte Harnschicht habe ich bei den Versuchen mit Harnsäure nicht konstatieren können.

Unter dem Titel „Gibt es eine physiologische Albuminurie" ist eine spätere Abhandlung Oswalds*) erschienen. Er geht darin von seiner Auffassung über die Globulinnatur der durch Essigsäure aus dem Harne gefällten Eiweißsubstanz aus.

Selbst für den Fall, daß eine etwas größere Menge Eiweiß im Harne vorkam, hat Oswald, wie ich oben hervorgehoben habe, nicht den Beweis geliefert, daß freies Globulin in der durch Essigsäure aus dem Harne fällbaren Eiweißsubstanz vorkam. Daß Oswalds Auffassung für die Fälle, welche den

*) Oswald, Münch. med. Wochenschr. Nr. 15, 1904.

normalen Verhältnissen näher stehen, noch weniger begründet ist, kann als selbstverständlich angesehen werden, da er den normalen Verhältnissen keine Untersuchung gewidmet hat. Auf Grund meiner oben zitierten Untersuchungen bin ich berechtigt, diese Anmerkung gegen Oswald geltend zu machen. Schon vor mehr als 10 Jahren habe ich, wie jetzt Oswald, es als besonders wichtig angesehen, die Fragen über die Eiweißausscheidung unter normalen und den ihnen am nächsten stehenden pathologischen Verhältnissen näher zu beleuchten. Ich fand es dabei unumgänglich nötig, das näher zu ermitteln, was man als normal zu betrachten hat. Meine darauf bezüglichen Erfahrungen finden sich in der oben zitierten Abhandlung niedergelegt (S. 413 bis 433). Ich kann diese Erfahrungen mit um so größerer Berechtigung gegen Oswald aufrecht erhalten, als er keine solchen Untersuchungen mitgeteilt hat.

Ich konnte unter anderem nachweisen, daß wirkliches Eiweiß (mit den „eiweißfällenden Substanzen“ verbunden) in jeder untersuchten Harnprobe vorkam, auch in den Fällen, wo ich besonders eiweißfreie Proben von normalem Harn gesucht und ausgewählt hatte. Ich fand auch, daß die normale Eiweißmenge gar nicht so gering (0,6 mg pro Liter) ist, wie Oswald nach den Angaben von Noordens annimmt; sie kann viel größer veranschlagt werden. Oswald irrt, wenn er sagt, daß dieses Eiweiß in keiner Beziehung zur klinisch nachweisbaren Albuminurie steht; die Empfindlichkeit der benutzten Methode ist dabei von großer Bedeutung, und es ist gar nicht zu verwundern, wenn Forscher, die mit empfindlichen Proben arbeiteten, Eiweiß in 80 bis über 90 Prozent der untersuchten Harne unmittelbar nachweisen konnten. Sogar die Empfindlichkeit der Schichtprobe mit Salpetersäure nach Heller ragt in das Gebiet des im Harne normal vorkommenden Eiweißes hinein, wenn man nämlich mit gut filtriertem, völlig klarem Harn, der mäßiges oder ziemlich hohes Eigengewicht hat, arbeitet, und die Beobachtungszeit auf eine Viertelstunde oder mehr ausdehnt. Bei der Untersuchung von gesammelten Tagesmengen des Harns kann man oft in die Lage kommen, die Harne von mehreren mutmaßlich gesunden Personen prüfen zu müssen, bis man einen findet, in welchem man den Ausschlag als völlig negativ erklären kann; bei niedrigem Eigengewicht des Harnes oder bei der Untersuchung von einzelnen Harnentleerungen gelingt dies selbstverständlich leichter.

Da die unmittelbare Prüfung des Harns auf Eiweiß, wenn man nur hinreichend empfindliche Eiweißproben heranzieht, auch

das normal im Harne vorkommende Eiweiß anzeigen kann, und andererseits kleine Eiweißmengen eine pathologische Bedeutung haben können, so ist es nach meiner Erfahrung nicht möglich, mit Hilfe der Prüfung auf Eiweiß eine ganz scharfe Grenze zwischen den Gebieten des normalen und des pathologischen Zustandes zu ziehen.

XXXVIII.

Weitere Untersuchungen über Blutgerinnung.

Von Leo Loeb.

Aus dem pathologischen Laboratorium der University of Pennsylvania, Philadelphia.

In früheren Untersuchungen*) über die Gerinnung des Blutes von Wirbellosen und von Wirbeltieren wurde das Verhalten der in den Blutkoagulis oder im Blutserum und der in den Gewebsextrakten und in den Blutzellen vorhandenen gerinnungsbeschleunigenden Substanzen geprüft in ihrem Verhalten gegen das normale oder durch schwaches Erwärmen und Verdünnen vor spontaner Gerinnung bewahrte Blutplasma verschiedener Tiere. Unter anderem ergab sich eine Spezifizität der in den Gewebsextrakten enthaltenen gerinnungsbeschleunigenden Substanzen bei einer Vergleichung der Organe von Säugetieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und wirbellosen Tieren gegenüber dem Blute eines dieser Tiere. Innerhalb dieser Klassen selbst konnte ferner eine Spezifizität bei den Wirbellosen, nicht aber bei den Vögeln und nur zwischen einzelnen Säugetieren nachgewiesen werden**). Es ergab sich, daß spezi-

---

*) Biological Bulletin, May 1903. — Montreal Medical Journal, July 1903. — Diese Beiträge 5, 1904. — Virchows Archiv 176, 1904.

**) In den früheren Versuchen wurde in der großen Mehrzahl der Versuche das Blut einer Tierart in jeder der genannten Tierklassen mit dem Blut anderen Tierklassen angehöriger Tiere auf seine Reaktion gegenüber Gewebskoagulinen verglichen, die von Tieren verschiedener Klassen herstammten. Die Spezifizität der Gewebskoaguline zwischen weiter entfernten Tierarten konnte so als allgemein gültig nachgewiesen werden, da sie in den verschiedensten Tierklassen vorhanden ist; daran würde auch nichts geändert, falls sich Blutarten finden sollten, bei denen die Spezifizität nicht nachgewiesen werden könnte. Bei den Säugetieren kann eine Spezifizität zwischen Hundeblut und Kaninchen- und Katzengewebskoagulinen nicht nachgewiesen werden, wohl aber zwischen Hundeblut und Meerschweinchengewebsextrakten. Es ist möglich, daß wie zwischen nahe verwandten Tier-

fische und nichtspezifische Substanzen in diesen Extrakten vorhanden waren. Die Ähnlichkeit dieser spezifischen Wirkung mit der bei experimentell erzeugten Agglutininen, Lysinen, Antitoxinen beobachteten, wurde durch die Bezeichnung dieser Substanzen als Gewebskoaguline hervorgehoben, im Gegensatz zu den im Blutserum oder Koagulum vorhandenen, in diesem Sinne nicht spezifischen Substanzen, welche letztere sich auch in anderer Hinsicht von den Gewebskoagulinen unterscheiden*).

In den folgenden Untersuchungen wurde nun weiterhin geprüft, wie sich diese beiden gerinnungserregenden Faktoren gegenüber Peptonblut und gegen Fluoridplasma verhalten. In meinen früheren

arten eine Spezifizität des Präzipitins wohl noch vorhanden ist, aber die Quantität gemeinsamer Präzipitine überwiegt, ähnliche Verhältnisse auch in bezug auf die Gewebskoaguline vorhanden sind. Eine vorhandene Spezifizität wird möglicherweise durch andere Umstände verdeckt.

In diesen Versuchen wurde Hundeblut benutzt und gegenüber Säugetier- und Taubenextrakten geprüft. Hundeblut gerinnt bei der in diesen Versuchen eingehaltenen Versuchsanordnung oft sehr schnell in allen geprüften Lösungen von Gewebsextrakten. Doch konnte in den Fällen, in denen die Koagulation langsamer erfolgte, nachgewiesen werden, daß Hundeblut in Meerschweinchen- und Taubenextrakten weniger rasch koagulierte als in Hundegewebsextrakten. In einzelnen Versuchen wurde auch das Verhalten des frischen Hundeblutes gegenüber Gewebsextrakten mit dem des Peptonblutes oder des Fluoridplasmas des Hundes verglichen. Die hierüber angestellten Versuche sind noch nicht zahlreich genug. Doch ergab sich, daß eine im frischen Blut nachweisbare Spezifizität im Peptonblut oder im Fluoridplasma des Hundes nicht mehr nachweisbar zu sein braucht. Ist die Spezifizität aber so stark ausgeprägt wie die des Gänseblutes gegenüber Taubengewebsextrakten einerseits und Hundegewebsextrakten andererseits, so läßt sie sich auch im Fluoridplasma nachweisen.

*) Nach Abschluß dieser Arbeit erschien eine Mitteilung von Muraschew über die Spezifizität des Fibrinfermentes und seiner Vorstufen (D. Arch. f. klin. Medizin 80), in welcher dieser Autor im wesentlichen zu mit meinen früheren Untersuchungen übereinstimmenden Resultaten gelangt. Muraschew nimmt jedoch in gewissen Fällen eine absolute Spezifizität an, wo ich nur eine relative fand; so soll Leberextrakt des Vogels gegen Hundeblut ohne Wirkung sein, während ich nur eine schwächere Wirkung des Leberextraktes der Taube gegenüber Hundeblut fand. Der Widerspruch erklärt sich wohl dadurch, daß Muraschew eine Hundefibrinogenlösung, ich Hundeblut oder Hundepeptonblut oder Fluoridplasma benutzte. Dem letzten Reagens gegenüber erweisen sich Organextrakte der Taube in Verbindung mit Hundeserum nicht ebenso aktiv wie Organextrakte des Hundes. Ich möchte ferner nicht die Identität aller Wirbeltierthrombine als sicher annehmen. Gewisse Erwägungen legen sogar die Vermutung nahe, daß sie verschieden sind; aber eine Spezifizität in dem Sinne einer speziellen Anpassung eines Thrombins an das Blut der eigenen oder einer verwandten Tierart, wie sie sich bei den durch Immunisierung erhaltenen Substanzen und bei den Gewebskoagulinen in nicht zu engen Grenzen findet, kann hier nicht nachgewiesen werden.

Arbeiten hatte ich den Angriffspunkt der Gewebskoaguline unbestimmt gelassen. Es wurde nun versucht, hierüber Aufschlüsse zu erhalten, besonders mit Rücksicht auf die Anschauungen, die vor kurzem Morawitz entwickelt hat*), und zwar hauptsächlich auf Grund der von ihm gefundenen interessanten Tatsache, daß auf Fibrinogen allein nicht wirksames Gewebsextrakt die Wirkung des Serums auf das Fibrinogen verstärkt. Es wurde ferner das Verhalten der Gewebskoaguline unter gewissen pathologischen Bedingungen geprüft.

I. Über die Wirkungsweise der Gewebskoaguline.

Während Alexander Schmidt**) annahm, daß in den Zellen vorhandene Substanzen das Proferment aktivieren, glaubte Wooldridge,***) daß seine Gewebsfibrinogene direkt auf die gerinnungsfähige Substanz des Blutes wirkten. Arthus†) wiederum war der Meinung, daß die Gewebsextrakte die Bildung des Fibrinfermentes beschleunigen durch eine Wirkung auf die Leukocyten. Daß die Gewebsextrakte unabhängig von Leukocyten wirksam sein können, ergibt sich schon aus ihrer Wirksamkeit Gänseplasma gegenüber. Gestützt auf die von ihm gefundene Tatsache, daß eine Kombination von Serum und Gewebsextrakt auf diese Fibrinogenlösung stärker wirkt als Serum allein, und daß, wie bekannt, Gewebsextrakt gewöhnlich einer solchen Lösung gegenüber wirkungslos ist, bringt Morawitz den wirksamen Bestandteil der Gewebsextrakte mit der Enterokinase und ähnlichen anderen Stoffen in Analogie und nennt ihn Thrombokinase. Thrombokinase wandelt Thrombogen in Prothrombin um, das sodann mit Hilfe von Calcium ein aktives Fibrinferment wird.

Dieselbe Verstärkung der gerinnungsbeschleunigenden Wirkung einer Kombination von Serum und Extrakt kann auch dem Fluoridplasma der Gans und des Hundes gegenüber nachgewiesen werden.

*) Die Arbeiten von Morawitz, sowie die von Fuld und Spiro, und Bordet und Gengou erschienen, während diese Untersuchungen, die im Herbste 1903 begonnen wurden, im Gange waren. Ich selbst hatte schon im Laufe meiner früheren Versuche im Frühjahr 1903 die Wirkung einer Kombination von Gewebskoagulinen und Blutkoagula auf das Gänseplasma geprüft, ohne damals eine merkliche Beschleunigung der Gerinnung beobachten zu können. Vgl. Morawitz, Beiträge z. Kenntnis der Blutgerinnung. — D. Arch. f. klin. Medizin 79, Dezember 1903. — Diese Beiträge 5, Januar 1904. — Fuld und Spiro, Diese Beiträge 5, 1904. — Bordet et Gengou, Annales de l'Institut Pasteur 1904.

**) A. Schmidt, Zur Blutlehre. Leipzig 1892.

***) Wooldridge, Die Gerinnung des Blutes. Leipzig 1891.

†) Arthus, Journal de Physiol. normale et pathologique 4, 281 (1902).

Wenn das Fluoridplasma so hergestellt wird, daß in einer 0,6proz. Natriumfluoridlösung oder in einer n/10-Kaliumfluoridlösung etwas weniger als das gleiche Volum Blut aufgefangen wird, so bringen in der Mehrzahl der Fälle Gewebsextrakte allein, falls sie in genügender Menge zugesetzt werden, das Fluoridplasma zur Gerinnung und man kann dann die Spezifizität der Vogelgewebsextrakte im Vergleich zu Hundegewebsextrakten Gänsefluoridplasma gegenüber leicht nachweisen; Hundefluoridplasma gegenüber kann man eine Spezifizität von Hundegewebsextrakten im Vergleich zu Taubengewebsextrakten sehr oft nicht nachweisen, während dem frischen Hundeblut gegenüber eine solche Spezifizität, wenn auch nicht sehr ausgeprägt, vorhanden ist. Falls nun die Verstärkung bei der Kombination von Serum und Gewebsextrakt nur dadurch bewirkt wird, daß das Gewebsextrakt das Proferment des Serums aktiviert, in ähnlicher Weise wie dieser Annahme zufolge Gewebsextrakt auf Blut nur durch Aktivierung des Profermentes koagulierend wirken soll, so sollte die Spezifizität der Gewebskoaguline, ganz besonders in der Kombination von Gewebskoagulinen und Serum hervortreten, da ja der ganze Zuwachs an gerinnungsbeschleunigender Wirkung bei der Kombination dieser beiden Stoffe der erwähnten Theorie zufolge nur durch die Einwirkung des zugefügten Gewebskoagulins auf das Proferment des zugefügten Serums hervorgebracht wird. Es müßte z. B., falls ein Zuwachs der Gerinnungsbeschleunigung durch eine Kombination von Taubenserum und Taubengewebsextrakt Hundefluoridplasma gegenüber vorhanden ist, dieser Zuwachs entsprechend größer sein bei Kombination von Taubenserum und Taubenextrakt, als bei Kombination von Taubenserum und Hundeextrakt, da die spezifische Wirkung der Taubenextrakte im Vergleich zu Hundekoagulinen Vogelblut gegenüber ausgesprochen ist. Ferner müßte der durch die Kombination bewirkte Zuwachs unabhängig davon sein, ob die Kombination dem Fluoridplasma des Hundes oder des Vogels gegenüber in Verwendung kommt.

Wenn ferner das Serum allein die wirksame Substanz in Form einer Vorstufe enthält, das Extrakt aber nur indirekt, nämlich auf das Proferment wirkt, so sollte die Quantität des zugesetzten Serums von der größten Bedeutung für die Stärke der Gerinnungsbeschleunigung sein, ebenso wie eine größere Menge Serum eine stärkere Wirkung auf Fluoridplasma ausübt, als eine kleinere Menge. Wir sollten demnach erwarten, daß eine Kombination einer größeren Quantität Serum mit einer geringeren Menge

Gewebsextrakt einen viel stärkeren Zuwachs an gerinnungsbeschleunigender Wirkung bewirkt als eine Kombination einer größeren Quantität Gewebsextrakt mit einer ganz geringen Quantität Serum.

Versuche zeigten nun, daß die letztere Kombination einen ebenso starken Zuwachs an gerinnungserregender Kraft bewirkt, wie die erstere, daß aber beide Kombinationen in einigen Fällen etwas schwächer wirken als eine Kombination von gleichen Teilen Serum und Gewebsextrakt.

Das Fluoridplasma war hergestellt durch Auffangen von Hundeblut in einem gleichen Volumen einer 0,6 proz. NaF-Lösung.

Mischung (LE = Leberextrakt von Hund, S = Serum, FP = Fluoridplasma)	Gerinnungszeit
$^1/_2$ ccm LE + $^1/_2$ ccm FP	nach 22 Min. klein. Koagulum. n. 35 Min. ganz koaguliert,
$^1/_2$ „ S + $^1/_2$ ccm FP	9 Minuten.
$^1/_4$ „ LE + $^1/_4$ ccm 0,85 proz. NaCl-Lösung + $^1/_2$ ccm FP	noch flüssig am nächsten Tage
$^1/_4$ „ S + $^1/_4$ ccm 0,85 proz. NaCl-Lösung + $^1/_2$ ccm FP	1 Stunde 5 Minuten.
$^1/_4$ „ LE + $^1/_4$ ccm S + $^1/_2$ ccm FP	2 Minuten 50 Sekunden.
$^1/_2$ „ LE + $^1/_2$ „ S + 1 ccm FP	$1^1/_4$ Minuten.
$^1/_2$ „ LE + $^1/_2$ „ S + 1 „ FP	$3^1/_2$ „
0,1 „ S + 0,9 ccm LE + 1 ccm FP	$2^1/_4$ „
0,1 „ LE + 0,9 S + 1 ccm FP	$1^1/_2$ „

Hier besteht eine ganz kleine Differenz zu Gunsten der Mischung, die mehr Serum enthielt; in dem folgenden Versuch findet das Umgekehrte statt.

Mischung	Gerinnungszeit
$^1/_2$ ccm S + $^1/_2$ ccm LE + 1 ccm FP	1 Minute 50 Sekunden.
0,1 „ LE + 0,9 ccm S + 1 ccm FP	3 Minuten 5 „
0,9 „ LE + 0,1 „ S + 1 „ FP	2 „ 10 „
0,9 „ S + 0,1 ccm LE + 1 „ FP	3 „ 50 „
0,9 „ LE + 0,1 „ S + 1 ccm FP	2 „ 30 „
$^1/_2$ „ S + $^1/_2$ ccm LE	1 Minute 55 Sekunden.
1 LE + 1 FP	$6^1/_2$ Minuten.
1 S + 1 FP	6 „

In bezug auf die erste Fragestellung wurden Versuche in folgender Weise angestellt: Fluoridplasma des Hundes wurde auf oben angegebenem Wege hergestellt; in gleicher Weise das der Gans. Extrakte der Leber von Hund, Taube, Meerschweinchen, der Muskeln von Hund und Taube wurden in quantitativ gleicher Weise hergestellt. Durch Ausspülen der Blutgefäße mit Salzlösung wurde in allen Fällen die Leber von Blut befreit; die Muskeln wurden nach Zerschneiden mit Salzlösung ausgewaschen, nachdem

sie dem vorher möglichst entbluteten Tiere entnommen waren. Das Blutserum wurde von Hund, Taube und Meerschweinchen gewonnen. Die Wirkung der Extrakte und Sera wurde gesondert und kombiniert Hunde- und Gansfluoridplasma gegenüber geprüft. Solcher Versuche wurden drei angestellt. In drei weiteren Versuchen wurden Extrakte und Sera auf Hundefluoridplasma allein geprüft; ferner wurden in einigen Versuchen Sera und Extrakte anderer Säugetiere untersucht.

In der Mehrzahl der Fälle wurde der Zuwachs der Gerinnungsbeschleunigung, welcher durch den Zusatz von Extrakt zum Serum bewirkt wurde, nicht oder jedenfalls nicht in erster Linie durch den Einfluß des Extraktes auf das Serum, sondern auf das Fluoridplasma bestimmt. Nur in einigen wenigen Fällen war die Deutung möglich, daß der Zuwachs an Gerinnungsbeschleunigung durch Einwirkung von Extrakt auf das Serum zustande komme.

Es ergab sich ferner, daß die Wirkung des Taubenserums, auch wenn es allein ebenso stark auf das Fluoridplasma wirkte wie Hundeserum, durch Extrakte viel weniger beschleunigt wurde als die des letzteren. Ebenso war Meerschweinchenserum regelmäßig weit schwächer wirksam als Hundeserum und wurde auch durch Zusatz von Extrakten nicht so verstärkt, daß die kombinierte Wirkung der der kombinierten Extrakt-Hundeserumwirkung gleichgekommen wäre. Hingegen waren Kaninchen- und Katzenserum allein oder in Verbindung mit Extrakten gewöhnlich wirksamer als Meerschweinchen- und Taubenserum allein oder in Verbindung mit Extrakten.

Als Beispiel seien Teile von Versuch III mitgeteilt:

(HS = Hundeserum. GB = ungeronnenes Gänseblut. HLE = Hundeleberextrakt. NaCl = 0,85 proz. NaCl-Lösung. TS = Taubenserum. TLE = Taubenleberextrakt. HFP = Hundefluoridplasma. MLE = Meerschweinchenleberextrakt. HME = Hundemuskelextrakt. TME = Taubenmuskelextrakt. MS = Meerschweinchenserum. GFP = Fluoridplasma der Gans.)

Mischung	Gerinnungszeit
1/2 ccm HS + 1/2 ccm GB	5 Minuten 20 Sekunden
1/2 „ HLE + 1/2 „ GB	3 „ 10 „
1/4 „ HLE + 1/4 ccm NaCl + 1/2 ccm GB	5 „ 20 „
1/2 „ TS + 1/2 ccm GB	4 „
1/2 „ TLE + 1/2 ccm GB	1 Minute 32 Sekunden
1/4 „ TLE + 1/4 „ NaCl + 1/2 ccm GB	2 Minuten 20 „
1/4 „ HS + 1/4 ccm HL + 1/2 ccm GB .	3 „ 10 „
1/4 „ HS + 1/4 ccm TL + 1/2 ccm GB .	1 Minute 10 „

Hier wirken die Extrakte in den Kombinationen mit Serum, (wobei durch die Kombination nur ein geringfügiger Zuwachs

an gerinnungserregender Wirkung bewirkt wird), hauptsächlich auf das Gänseblut und nicht, oder nur in geringem Grade, auf das Serum.

Mischung	Gerinnungszeit
$^1/_2$ ccm HLE + $^1/_2$ ccm HFP .	am nächsten Morgen eine Spur von Koagulum.
$^1/_2$ „ TLE + $^1/_2$ „ HFP .	„ „ „ „ „ „ „
$^1/_2$ „ MLE + $^1/_2$ „ HFP .	„ „ „ „ „ „ „
$^1/_2$ „ HME + $^1/_2$ „ HFP .	„ „ „ „ „ „ „
$^1/_2$ „ TME + $^1/_2$ „ HFP .	„ „ „ „ „ „ „
1 „ HLE + $^1/_2$ „ HFP .	„ „ „ „ „ „ „
1 „ TLE + $^1/_2$ „ HFP .	31 Min. z. Teil koaguliert, n. 6 Stdn. koaguliert.
1 „ HME + $^1/_2$ „ HFP .	24 „ z. „ „ n. 55 Min. ganz „
1 „ TME + $^1/_2$ „ HFP .	am nächsten Morgen Spur von Koagulum.
$^1/_2$ „ TS + $^1/_2$ ccm HFP .	$9^1/_2$ Min. koaguliert.
$^1/_2$ „ MS + $^1/_2$ ccm HFP .	$1^1/_2$ Stunden kleines Koagulum, am nächsten Morgen koaguliert.
$^1/_2$ „ HS + $^1/_2$ ccm HFP .	13 Min. beginnendes Koagulum, 19 Min. koaguliert.

Wir sehen, daß hier Taubenleberextrakt etwas stärker wirkt gegenüber Hundefluoridplasma als Hundeleberextrakt, hingegen Hundemuskelextrakt viel stärker als Taubenmuskelextrakt. Also hier ist keine Spezifizität gegenüber Hundefluoridplasma nachweisbar.

Mischung	Gerinnungszeit
$^1/_2$ ccm HLE + $^1/_2$ ccm GFP	nach $3^1/_2$ Stunden noch nicht geronnen, am nächsten Tage Fadenbildung.
$^1/_2$ „ TLE + $^1/_2$ „ GFP	nach $3^1/_2$ Stunden noch nicht geronnen, am nächsten Tage Fadenbildung.
$^1/_2$ „ MLE + $^1/_2$ „ GFP	nach $3^1/_2$ Stunden noch nicht geronnen, am nächsten Tage Fadenbildung.
$^1/_2$ „ HME + $^1/_2$ „ GFP	nach $3^1/_2$ Stunden noch nicht geronnen, am nächsten Tage Fadenbildung.
$^1/_2$ „ TME + $^1/_2$ „ GFP	nach $3^1/_2$ Stunden noch nicht geronnen, am nächsten Tage Fadenbildung.
$^1/_2$ „ TS + $^1/_2$ ccm GFP .	noch nicht koaguliert nach 23 Minuten, koaguliert nach 30 Minuten.
$^1/_2$ „ HS + $^1/_2$ „ GFP .	noch nicht koaguliert nach 30 Minuten, koaguliert nach etwa 2 Stunden.
$^1/_2$ „ MS + $^1/_2$ „ GFP .	noch nicht koaguliert nach 30 Minuten, koaguliert nach etwa 2 Stunden.

Da das Fluoridplasma der Gans unter dem Einfluß der Gewebsextrakte nur schwer gerann, so kommt hier die spezifische Einwirkung der Extrakte allein auf das Fluoridplasma der Gans nicht zum Ausdruck; wohl aber geschah dies in anderen (hier nicht mitgeteilten) Versuchen, in denen das Fluoridplasma leichter gerann.

Mischung	Gerinnungszeit
1/4 ccm TS + 1/4 ccm HLE + 1/2 ccm HFP	nach 15 Min. teilweise koaguliert, nach 24 Min. ganz " .
1/4 " TS + 1/4 " TLE + 1/2 " HFP	nach 15 Min. teilweise " . nach 24 Min. ganz " .
1/4 " TS + 1/4 " TLE + 1/2 " HFP	nach 10 Min. kleines Koagulum, nach 30 Min. ganz koaguliert.
1/4 " TS + 1/4 " HLE + 1/2 " HFP	nach 30 Min. 1/2 koaguliert, nach 52 Min. ganz koaguliert.
1/4 " TS + 1/4 " MLE + 1/2 " HFP	nach 18 Min. kleines Koagulum, nach 30 Min. fast ganz koag.
1/4 " TS + 1/4 " HME + 1/2 " HFP	nach 17 Min. großenteils " , nach 30 Min. ganz " .
1/4 " TS + 1/4 " TME + 1/2 " HFP	nach 17 Min. kleines Koagulum, nach 30 Min. ganz koaguliert.
1/4 " HS + 1/4 " HLE + 1/2 " HFP	nach 1 1/2 Minuten koaguliert.
1/4 " HS + 1/4 " TLE + 1/2 " HFP	" 1 1/2 " "

Wir finden hier die verschiedenen Extrakte in Kombination mit Serum ungefähr gleich wirksam.

Obwohl Taubenextrakte auf Vogelblut viel stärker wirkten als Hundeextrakte, war eine Kombination von Taubenserum und Taubenextrakten Hundefluoridplasma gegenüber nicht wirksamer als eine Kombination von Taubenserum und Hundegewebsextrakten. Wohl aber kommt die spezifische Wirkung der Taubenextrakte zur Geltung, wenn dieselbe Kombination anstatt auf Hundeplasma auf Vogelplasma wirkt, wie die folgende Tabelle zeigt.

Mischung	Gerinnungszeit
1/4 ccm HS + 1/4 ccm TME + 1/2 ccm GFP	2 Minuten.
1/4 " HS + 1/4 " HME + 1/2 " GFP	teilweise koaguliert nach 1 Stde., koaguliert am nächst. Morgen.
1/4 " HS + 1/4 " MLE + 1/2 " GFP	koaguliert nach 1 Stunde.
1/4 " HS + 1/4 " TLE + 1/2 " GFP	3 1/2 Minuten.
1/4 " HS + 1/4 " HLE + 1/2 " GFP	noch nicht nach 1 Stde. koagul., am nächst. Morgen koaguliert.
1/4 " TS + 1/4 " TME + 1/2 " GFP	nach 18 Minuten koaguliert.
1/4 " TS + 1/4 " HME + 1/2 " GFP	noch nicht koagul. nach 50 Min., koagul. nach 1 Stde. 20 Min.
1/4 " TS + 1/4 " MLE + 1/2 " GFP	noch nicht koagul. nach 50 Min., koagul. nach 1 Stde. 20 Min.
1/4 " TS + 1/4 " HLE + 1/2 " GFP	koaguliert nach 1 Stde. 20 Min.
1/4 " TS + 1/4 " TLE + 1/2 " GFP	koaguliert nach 21 Minuten.

Wir sehen hier deutlich, daß der Zuwachs an gerinnungsbeschleunigender Kraft in der Kombination von Serum und Extrakt hauptsächlich durch einen Einfluß des Extrakts auf das Fluoridplasma bedingt ist. Dem Fluoridplasma der Gans gegenüber ist hier die Kombination von Taubenserum und Taubengewebs-

extrakten sogar weniger wirksam, als die Kombination von Hundeserum und Vogelextrakten.

Ein ähnliches Resultat ergab der erste Versuch. Nur war hier in einem einzigen Falle die Kombination Hundeleberextrakt und Hundeserum dem Vogelfluoridplasma gegenüber wirksamer als Taubenleberextrakt und Hundeserum. Aber auch in diesem Falle zeigte das Muskelextrakt das typische Verhalten. Dasselbe Ergebnis hatten auch die übrigen Versuche. Nur in wenigen Fällen konnte möglicherweise die verstärkende Wirkung der Kombination von Serum und Extrakt durch eine direkte Wirkung des Extraktes auf das Serum erklärt werden*).

II. Über die Gerinnung des Peptonblutes.

Es ist bekannt, daß während Gewebsextrakte Peptonblut gewöhnlich leicht zur Gerinnung bringen, Blutserum einen viel geringeren gerinnungserregenden Einfluß hat, ferner daß Peptonblut einen die Blutgerinnung hemmenden Stoff enthält. Es kommen jedoch, wie das besonders Wooldridge beobachtete, große Unterschiede in der Gerinnungsfähigkeit des Peptonblutes verschiedener Hunde vor. Es wurde nun das Peptonblut vieler Hunde auf sein Verhalten gegen Serum und Gewebsextrakte geprüft und es ergab sich:

1. Daß Peptonblut zuweilen schnell unter dem Einfluß von Hundeserum gerinnt, daß dies aber nicht häufig ist.

2. Daß die Sera anderer Wirbeltiere, die geprüft wurden, so von Kaninchen, Meerschweinchen, Katze, Ratte, Taube, Gans, in der großen Mehrzahl der Fälle einen stärker beschleunigenden Einfluß auf das Peptonblut des Hundes haben, als Hundeserum, sodaß sie oft fast ebenso stark wirken wie Gewebsextrakte.

*) Eine ähnliche Verstärkung der Wirkung wie bei der Kombination von Serum und Extrakt, wurde auch von Th. Sl. Price (Zeitschrift f. physik. Chemie 27, 1898) und von Bredig und Brown (Zeitschrift f. physik. Chemie 46, 1903) bei der Kombination von gewissen anorganischen katalytisch wirkenden Substanzen beobachtet. In diesen Fällen wirkten bereits beide Substanzen allein katalytisch. Daß etwas ähnliches möglicherweise auch beim Serum und Gewebsextrakt stattfindet, darauf scheinen die hier mitgeteilten Versuche hinzuweisen. Dem steht anscheinend die Tatsache entgegen, daß Gewebsextrakte allein nicht auf eine Hammarstensche Fibrinogenlösung wirken. Vielleicht muß aber doch die Möglichkeit berücksichtigt werden, daß eine künstliche Fibrinogenlösung sich nicht ganz wie das im Blut vorhandene Fibrinogen verhält, worauf schon Wooldridge hingewiesen hat. Es wäre hierbei auch daran zu erinnern, daß durch eine Verdünnung des Gänseplasmas die Wirksamkeit der Gewebstücke relativ stärker geschwächt wird als die der Koagula.



3. Daß dann, wenn ein anderes Serum auf Peptonblut absolut schwächer wirkt als Hundeserum, das erstere im Vergleich zu Hundeserum Peptonblut gegenüber wenigstens eine relativ stärkere Wirkung ausübt als Hundeserum, wenn man die Stärke beider Sera gegenüber Fluoridplasma mit der gegenüber Peptonblut vergleicht. Nimmt man das Verhalten der Sera Fluoridplasma gegenüber als Maß ihrer gerinnungsbeschleunigenden Wirkung, so verliert Hundeserum stärker an gerinnungsbeschleunigender Kraft, als die anderen Sera, wenn man die Sera gegenüber Peptonblut des Hundes prüft.

4. Während eine Kombination von Serum und Gewebsextrakt Fluoridplasma gegenüber wirksamer ist als eine der beiden Komponenten, hat diese Kombination Peptonblut gegenüber die umgekehrte Wirkung. Die gerinnungsbeschleunigende Wirkung der Gewebsextrakte wird durch den Zusatz von Blutserum gewöhnlich merklich, oft sehr stark vermindert.

Dieser Einfluß des Serums in Kombination mit Extrakt geht gewöhnlich parallel dem des unkombinierten Serums auf Peptonblut. Falls also Hundeserum allein die Gerinnung des Peptonblutes merklich beschleunigt, wirkt es auch gewöhnlich nicht hemmend auf das Extrakt, sondern mag es sogar in seiner Wirkung verstärken. Es kommt aber doch zuweilen vor, daß Hundeserum allein ziemlich schnell Gerinnung verursacht, daß es aber auf Extrakte dennoch einen hemmenden Einfluß ausübt.

Wie die Sera anderer Tiere, soweit sie geprüft wurden, gewöhnlich allein stärker koagulierend wirken, als Hundeserum, so haben sie auch in Kombination mit Gewebsextrakten entweder keine hemmende (eventuell sogar eine beschleunigende) oder wenigstens eine in geringerem Grade hemmende Wirkung Peptonblut gegenüber als Hundeserum.

5. Die Wirkung des Serums in Kombination mit Extrakten ist gewöhnlich deutlich, wenn das Serum $^1/_3$ der Gesamtmischung ausmacht; sie kann auch noch klar hervortreten, wenn das Serum $^1/_4$ bis $^1/_6$ der Mischung beträgt; oft ist aber das Verhalten des Serums dann weniger deutlich zu erkennen.

6. Auf Peptonblut, das der spontanen Gerinnung sehr nahe ist, wirkt Serum in Kombination mit Gewebsextrakten meistens nicht hemmend.

7. Falls die hemmende Wirkung des Serums auf die Wirkung des Extraktes Peptonblut gegenüber nicht klar zu Tage treten sollte, kann diese hemmende Wirkung deutlicher werden, wenn statt Peptonblut Peptonplasma verwendet wird, welches ge-

wöhnlich weniger leicht gerinnt, als das die Blutzellen enthaltende Peptonblut.

8. Die hemmende Wirkung des Serums wird nicht zerstört durch ein $^3/_4$stündiges Erwärmen auf 56 bis 58°. Hat ein Serum einen beschleunigenden Einfluß auf Peptonblut, so wird durch $^3/_4$stündiges Erwärmen auf dieselbe Temperatur diese beschleunigende Wirkung nicht aufgehoben.

Im einzelnen war das Ergebnis der Versuche folgendes:

In 43 Versuchen hatte das Hundeserum in Kombination mit Gewebsextrakten 34mal eine hemmende Wirkung, 9mal keine. Unter diesen 9 Fällen hatte das Hundeserum allein in 8 Fällen eine die Gerinnung des Peptonblutes merklich beschleunigende Wirkung. Zudem war in einigen dieser 9 Fälle schon bald spontan eine geringfügige Gerinnung des Peptonblutes eingetreten. In einem anderen dieser 9 Fälle, in dem das Hundeserum allein keine stark gerinnungserregende Wirkung hatte, führte bloße Verdünnung des Peptonblutes schon in $2^1/_2$ Stunden den Beginn der Koagulation herbei. Also war auch hier das Peptonblut nahe der spontanen Gerinnung.

In einem Falle hatte das Serum nach 24 Stunden langem Stehen seine hemmende Wirkung verloren.

In 27 Versuchen wurde das Hundeserum mit dem Serum einer oder mehrerer anderer Tierarten verglichen; in einigen dieser Fälle hatten schon die Sera allein eine merklich beschleunigende Wirkung auf die Gerinnung des Peptonblutes. In 23 dieser Versuche hatte das Hundeserum in Kombination mit Extrakten eine hemmende Wirkung. In 18 von diesen 23 Fällen hatte das Hundeserum eine stärker hemmende Wirkung als die Sera mehrerer anderen Tierarten (oder einer anderen Tierart), die mit dem Hundeserum verglichen wurden; die anderen Sera hemmten entweder das Extrakt weniger oder hatten sogar eine beschleunigende Wirkung. In den 5 anderen Versuchen wirkte das Hundeserum wohl stärker hemmend als ein Teil der anderen Sera, aber einige andere Sera, mit denen das Hundeserum verglichen wurde, hatten in diesen Fällen einen ebenso stark hemmenden oder in einigen wenigen Fällen sogar einen stärker hemmenden Einfluß als das Hundeserum. In 4 Fällen übte das Hundeserum keine hemmende Wirkung auf das Extrakt aus. In 2 dieser Fälle hatten die anderen Sera eine noch stärker gerinnungsbeschleunigende Wirkung, in dem 3. Fall waren die Unterschiede wenig deutlich und nur in einem Fall wirkten einige Blutsera weniger beschleunigend als Hundeserum. Wenn man

aber solche Sera, die scheinbar stärker hemmend wirken als Hundeserum, in ihrer Wirkung auf Fluoridplasma mit Hundeserum vergleicht, so findet man, daß hier das Hundeserum die Gerinnung des Fluoridplasmas relativ stärker beschleunigt als die andern Sera, so daß der Verlust an gerinnungsbeschleunigender Wirkung dem Peptonblut gegenüber beim Hundeserum am größten ist. Dies wurde in 4 Fällen gefunden.

Folgender Versuch möge als Beispiel angeführt werden:

Das Peptonblut war hergestellt worden durch Injektion von 0,7 g Pepton pro Kilo Hund. (PB = Peptonblut, HME = Hundemuskelextrakt. HLE = Hundeleberextrakt. HS = Hundeserum. KS = Kaninchenserum. MS = Meerschweinchenserum. RS = Rattenserum. KS = Katzenserum. NaCl = 0,85 proz. NaCl-Lösung.)

Mischung	Gerinnungszeit
1 ccm HME + 1 ccm HS + 1 ccm PB	noch nicht koaguliert nach 1 Stunde 40 Min., am nächsten Morgen Spur von Koagulum.
1 „ HME + 1 „ NaCl + 1 „ PB	1½ Minuten.
1 „ HME + 1 „ HS + 1 „ PB	noch nicht koaguliert nach 1 Stde. 40 Min., ⅓ koaguliert am nächsten Morgen.
1 „ HME + 1 „ NaCl + 1 „ PB	1½ Minuten.
1 „ HLE + 1 „ HS + 1 „ PB	Koagul. beginnt nach 17 Min., ein wenig fortgeschritten nach 1 Stde. 35 Min., ⅔ koagul. am nächst. Morg.
1 „ HLE + 1 „ NaCl + 1 „ PB	1 Minute.
1 „ HLE + 1 „ HS + 1 „ PB	Koagul. beginnt nach 17 Minuten, ⅔ koaguliert am nächsten Morgen.
1 „ HLE + 1 „ NaCl + 1 „ PB	1 Minute.
1 „ HLE + 1 „ KS + 1 „ PB	2 Minuten.
1 „ HLE + 1 „ MS + 1 „ PB	4 „
1 „ HLE + 1 „ RS + 1 „ PB	2 „
2 „ HS + 1 „ PB	noch nicht koaguliert nach 80 Min., ganz unbedeutendes Koagulum am nächsten Morgen.
2 „ KS + 1 „ PB	11 Minuten.
2 „ MS + 1 „ PB	17 „
2 „ NaCl + 1 „ PB	ganz unbedeutendes Koagulum am nächsten Morgen.

Die gerinnungshemmende Wirkung des Serums ist aber nicht immer so stark wie in diesem Versuche. Erhitzen des Hundeserums im Wasserbade auf 57 bis 58° während ¾ Stunden, hebt die gerinnungshemmende Wirkung nicht auf:

Mischung	Gerinnungszeit
1 ccm HME + 1 ccm erhitztes HS + 1 ccm PB	noch nicht koaguliert nach 20 Minuten, koaguliert am nächsten Morgen.

Mischung	Gerinnungszeit
1 ccm HME + 1 ccm nicht erhitztes HS + 1 ccm PB	noch nicht koaguliert nach 20 Minuten, koaguliert am nächsten Morgen.
1 ccm HME + 1 ccm erhitztes HS + 1 ccm PB	noch nicht koaguliert nach 20 Minuten, koaguliert am nächsten Morgen.
1 ccm HME + 1 ccm nicht erhitztes HS + 1 ccm PB	noch nicht koaguliert nach 20 Minuten, koaguliert am nächsten Morgen.
1 ccm HME + 1 ccm NaCl + 1 ccm PB . .	koaguliert nach $2^1/_2$ Minuten.

Die gerinnungsbeschleunigende Wirkung von Katzenserum auf Peptonblut wird durch $^3/_4$ stündiges Erhitzen auf 57 bis 58° nicht aufgehoben.

Mischung	Gerinnungszeit
2 ccm NaCl + 1 ccm PB	flüssig nach 3 Stunden
2 „ HS + 1 „ PB	„ „ 3 „
2 „ KS + 1 „ PB	geronnen innerhalb 12 Min.
2 „ KS + 1 „ PB	7 Minuten.
2 „ erhitztes KS + 1 ccm PB .	$7^1/_2$ „

Wir sehen also, daß in der großen Mehrzahl der Fälle der die Extraktwirkung hemmende Einfluß des Hundeserums dem Peptonblut des Hundes gegenüber stärker ist als der der bisher geprüften Sera anderer Tiere. Dies legt die Vermutung nahe, daß hier wiederum eine Spezifizität der Wirkung vorliegt, aber eine Spezifizität einer die Gerinnung hemmenden Wirkung. Doch müßte weiterhin noch untersucht werden, wie sich die verschiedenen Blutsera gegenüber dem Peptonblute anderer Tiere verhalten. Ob diese hemmende Substanz nun im normalen Blutserum vorgebildet ist und nur dem Peptonblut gegenüber deutlich zu Tag tritt, weil das Peptonblut die im Serum vorhandenen gerinnungsbeschleunigenden Substanzen möglicherweise abschwächt, oder ob die gerinnungshemmende Substanz im Blutserum erst durch einen im Peptonblut vorhandenen Stoff produziert wird, ist nicht sicher zu entscheiden. Die erstere Annahme erscheint aber als die wahrscheinlichere. Wir haben also mit der Möglichkeit des Vorhandenseins von spezifisch gerinnungshemmenden Substanzen im Blutserum zu rechnen und solche Substanzen könnten möglicherweise die Anwesenheit spezifischer gerinnungsbeschleunigender Substanzen im Blutserum verdecken. Diese Substanzen dürften vielleicht auch als einer derjenigen Faktoren in Betracht kommen, die das Flüssigbleiben des Blutes bedingen, solange das Blut mit intaktem Endothel in Berührung kommt. Solche Faktoren wären

um so wichtiger, als das Vorhandensein gerinnungshemmender Substanzen im Endothel sich bisher nicht nachweisen ließ.*)

Ebenso wie die Wirkung des Serums und der Gewebsextrakte auf Fluoridplasma es nicht wahrscheinlich machte, daß die Wirkung des Extraktes lediglich in einer das Proferment aktivierenden Tätigkeit besteht, so dürfte auch das Verhalten des Blutserums und der Kombination von Blutserum und Gewebsextrakten gegenüber Peptonblut gegen eine solche Annahme sprechen. Wir sahen, daß gegenüber Peptonblut das Hundeserum ähnlich schwach wie eine 0,85 proz. NaCl-Lösung wirkt, oder nicht selten die Gerinnung etwas stärker beschleunigt als die NaCl-Lösung. In Verbindung mit Gewebsextrakt wirkt das Serum aber gewöhnlich mehr oder weniger stark hemmend auf die gerinnungsbeschleunigende Wirkung der Gewebsextrakte. Würde das Gewebsextrakt lediglich das Blutserum aktivieren und wäre die aktivierte Substanz des Blutserums die allein gerinnungsbewirkende, so wäre ein solches Verhalten schwer verständlich, auch wenn durch die Mischung mit Peptonblut eine gerinnungshemmende Substanz in Tätigkeit versetzt würde. Denn die vorherige Mischung von Serum und Extrakt müßte ja sehr viel gerinnungsbescheunigende Substanz schaffen. Falls das Gewebsextrakt hingegen auch einen direkt die Gerinnung beschleunigenden Stoff enthielte und nicht nur indirekt durch die Aktivierung des Serums die Gerinnung beschleunigte, so wäre es leichter verständlich, daß ein im Blutserum vorhandener gerinnungshemmender Stoff die gerinnungsbeschleunigende Substanz des Blutserums nicht zur Geltung kommen läßt und daß er zugleich hemmend auf die direkt gerinnungsbeschleunigende Tätigkeit des Gewebsextraktes wirkt.

III. Über den Gehalt verschiedener Zellen an Koagulinen.

Vergleichende Untersuchungen über den Gehalt verschiedener Organe desselben Tieres an gerinnungsbeschleunigenden Substanzen

*) Das Vorhandensein solcher Substanzen im Endothel glaubte L. Gutschy (Zieglers Beiträge 84, 1903) kürzlich durch Versuche nachgewiesen zu haben. Ich konnte bei eigenen Versuchen die Ergebnisse von Gutschy, soweit sie diese Substanzen betreffen, nicht bestätigen. In einer jüngst erschienenen Arbeit teilt Muraschew Befunde in betreff einer gerinnungshemmenden Substanz im Gansplasma mit; auch er findet Hinweise auf eine Spezifizität dieser Substanz. Diese beiden unabhängig von einander festgestellten Tatsachen (meine Befunde wurden bereits am 1. April 1904 vor der American Association of Pathologists and Bacteriologists in Newyork vorgetragen) ergänzen sich und geben den daraus gezogenen Schlußfolgerungen erhöhtes Gewicht.

wurden von mir früher so angestellt, daß ungefähr gleich große Organstücke in zumeist verdünntes Gänseplasma gelegt wurden. Um das Gewebstück bildete sich früher oder später ein zuerst ganz lokalisiertes Koagulum, das dann nach der Peripherie fortschritt. Deutliche konstante Unterschiede zwischen Muskel und Leber vom Vogel ließen sich hierbei nicht nachweisen. Doch erwiesen sich oft die Lymphdrüsen des Meerschweinchens wirksamer als andere Organe dieses Tieres. Es wurden nun weiterhin Organextrakte von Säugetieren gegenüber dem Peptonblut und Fluoridplasma des Hundes geprüft. Die Extrakte wurden sowohl allein wie auch in Kombination mit Serum geprüft. Die Extrakte wurden in quantitativ gleicher Weise hergestellt, zu dem gleichen Gewicht Organ wurde eine abgemessene, in jedem Falle gleiche Menge 0,85proz. Kochsalzlösung zugesetzt; während einiger Minuten wurde Gewebe in der Salzlösung zerrieben und durch Gaze filtriert.

Unter diesen Umständen ergaben sich konstante Unterschiede zwischen verschiedenen Organextrakten. Beim Hund erwies sich die Leber bedeutend wirksamer als Muskelextrakt, Niere wirksamer als Leber. (Leber und Niere waren vor dem Versuch durch Ausspülen mit Kochsalzlösung von den Venen aus von Blut befreit worden, der Muskel, der ebenso wie die anderen Organe dem möglichst entbluteten Tiere entnommen war, wurde nur zerschnitten und mit Kochsalzlösung abgespült.) Pankreas war nur schwach wirksam im Vergleich zur Leber, doch zeigte es eine deutlich gerinnungsbeschleunigende Wirkung, im Gegensatz zur Leberpankreasdrüse der Arthropoden, die gegenüber dem Hummerplasma keine gerinnungsbeschleunigende Wirkung hat. Der Darmsaft der Arthropoden hemmt die sogenannte erste und auch die zweite Gerinnung der Arthropoden. Spült man den Dünndarm eines Hundes kurz aus, und führt dann in verschiedene Teile 0,85proz. Kochsalzlösung ein, und läßt sie etwa 5 bis 10 Minuten lang mit der Darmschleimhaut in Berührung, so zeigt die wieder entnommene Flüssigkeit eine deutlich gerinnungsbeschleunigende Wirkung, die sehr stark sein kann. Dieser Flüssigkeit ist oft Schleim beigemischt. In der gewöhnlichen Weise hergestellte Extrakte der Darmschleimhaut haben eine sehr stark gerinnungsbeschleunigende Wirkung. Durch Zusatz von Darmschleimhautextrakt zu Pankreasextrakt gewinnt der letztere an gerinnungsbeschleunigender Kraft, entsprechend der stärkeren Wirkung der Darmschleimhaut; das hierdurch wirksam gemachte Trypsin scheint also nicht der gerinnungsbeschleunigenden Wirkung wesentlich

entgegenzuwirken.*) Die verschieden starke Wirkung von Muskel und Leber könnte darauf zurückgeführt werden, daß der Säugetiermuskel sich weniger leicht zerkleinern läßt als die Leber; dem Unterschied zwischen Leber und Niere dürfte kaum die gleiche Ursache zugrunde liegen. Auch dürfte ein geringer Gehalt an Galle bei der Leber nicht in Betracht kommen, da die Leber jedesmal vor dem Zerkleinern gründlich abgespült wurde. ³/₄stündiges Erwärmen auf 56 bis 58° vermindert die Wirksamkeit aller Extrakte und auch der Waschflüssigkeit des Darmes. Hält man die Extrakte 30 Minuten lang in kochendem Wasser, so findet in vielen Fällen ein völliger Verlust ihrer Wirksamkeit statt. Dies ist aber nicht immer der Fall. Ein Teil der Wirksamkeit des Darmschleimhautextraktes oder der Waschflüssigkeit des Darmes blieb in einigen Versuchen erhalten. Diese sich scheinbar widersprechenden Ergebnisse sind vielleicht dadurch zu erklären, daß die Quantität der vorhandenen wirksamen Substanzen eine bestimmte Größe erreicht haben muß, bevor sie nachgewiesen werden können; möglicherweise sind jedoch in verschiedenen Extrakten verschiedene Substanzen vorhanden. Ferner muß die Möglichkeit des passiven Mitgerissenwerdens durch andere koagulierende Substanzen berücksichtigt werden. Weitere Untersuchungen sollen hierüber Aufschluß bringen. Bei quantitativen Versuchen ist ferner zu berücksichtigen, daß der Bodensatz eines Organextraktes stärker wirkt als die darüber stehende Flüssigkeit.

Es wurde weiterhin die Wirkung der Blutkörperchen auf die Gerinnung des Fluoridplasmas geprüft. Sie wurden durch Zentrifugieren von Hundefluoridblut gewonnen, das in der Weise hergestellt war, daß Hundeblut in einem etwas größeren Volum 0,6proz. Natriumfluorid- oder $^{n}/_{10}$-Kaliumfluoridlösung aufgefangen wurde. Nach dem ersten Zentrifugieren wurde das Fluoridplasma größtenteils abgegossen und die untere hauptsächlich rote Blutkörperchen, aber auch Blutplättchen enthaltende Schicht von der obersten, Blutplättchen und Leukocyten aber auch rote Blut-

*) Die stark gerinnungsbeschleunigende Wirkung des Darmschleimes und der Schleimhaut und die relativ schwache Wirkung von Pankreasextrakten dürften pathologisch von Interesse sein in bezug auf die an diesen Stellen stattfindenden Hämorrhagien. Die starke Wirkung der Darmschleimhaut und des Schleimes dürfte z. B. von Bedeutung sein bei Nachblutungen, wie sie nach Bissen von Anchylostoma nicht selten beobachtet werden. Diese Nachblutungen werden möglich gemacht durch das Vorhandensein einer die Blutgerinnung stark hemmenden Substanz im vorderen Körperende von Anchylostoma, wie sich in von mir in Verbindung mit Herrn Professor A. J. Smith angestellten Versuchen ergab.

körperchen enthaltenden, Schicht getrennt. Wir erhalten so eine obere und untere Schicht nicht gewaschener Blutzellen. In anderen Versuchen wurden nach der Trennung der beiden Schichten beide gesondert 2 bis 4 mal mit kalkfreier, sterilisierter 0,85 proz. Kochsalzlösung gewaschen und ebenso oft zentrifugiert. Nach dem ersten Waschen wurde die durch das zweite Zentrifugieren neugebildete obere weiße Schicht oft mit der durch das erste Zentrifugieren erhaltenen oberen Schicht vereinigt und nun die untere Schicht und die vereinigten beiden oberen Schichten getrennt gewaschen und zentrifugiert. So wurde eine gewaschene obere und untere Schicht von Blutzellen erhalten, — diese enthielten kein oder nur wenig Fluoridplasma; die untere Schicht enthielt auch nur wenige Blutplättchen, da die bei dem weiteren Zentrifugieren sich bildenden weißen oberen Schichten der Hauptsache nach abgegossen wurden.*) Diese verschiedenen Fraktionen von Blutkörperchen wurden nun allein oder in Verbindung mit Hundeserum und Gewebsextrakten gegenüber Hundefluoridplasma geprüft.**) Es ergab sich nun, daß die gewaschene und nicht gewaschene untere Schicht in fast allen Fällen in Kombination mit Serum sich ähnlich verhielten wie Gewebsextrakte; doch war ihre Wirkung nicht ganz so stark. Die gewaschene untere Schicht wirkte aber auch in der großen Mehrzahl der Fälle in Kombination mit Leberextrakt ähnlich wie Serum. Doch war letztere Wirkung in einer etwas geringeren Anzahl von Fällen vorhanden, als die erstere Wirkung in Kombination mit Serum. Der Unterschied zwischen der Wirksamkeit mit Serum einerseits und Extrakten andrerseits war größer, wenn zur Kombination die nicht gewaschene untere Schicht benutzt wurde; hier war die letztere Kombination (Blutkörperchen und Extrakt) in einer geringeren Anzahl von Fällen wirksam. Die gewaschene obere Schicht war in allen Fällen mit Serum sowohl wie mit Extrakten wirksam. Gegenüber Fluoridplasma allein war die nicht gewaschene untere Schicht in allen Fällen unwirksam. Blutkörperchen und Fluoridplasma wurden in diesen und den folgenden Versuchen in gleichen Mengen gemischt oder es wurde eine größere Menge von Blutkörperchen zu einer geringen

*) Über ähnliche Versuche mit Gansplasma wurde schon in meiner früheren Arbeit berichtet. Die zur Verfügung stehenden Apparate erlaubten eine weitergehende Trennung der Blutzellen nicht.

**) Die Mischung mit Serum oder Extrakt und Fluoridplasma geschah in denselben Verhältnissen wie die von Serum + Extrakt + Fluoridplasma in den früheren Versuchen. Blutkörperchen und Serum oder Extrakt wurden gewöhnlich in gleicher Quantität zugesetzt und die Summe beider war der des Fluoridplasmas gleich.

Menge Fluoridplasma hinzugefügt. Die gewaschene untere Schicht war allein ebenfalls in einer Anzahl von Fällen Fluoridplasma gegenüber wirkungslos. In anderen Fällen hingegen führte sie die Gerinnung einer gleich großen oder wenigstens einer geringeren Menge Fluoridplasma herbei. In einigen Fällen bildete sich nur ein Koagulum dicht um die roten Blutkörperchen, so daß der Anschein einer bloßen Agglutination erweckt wurde; jedoch ließ eine mikroskopische Untersuchung erkennen, daß auch in einem solchen Falle die Blutkörperchen von Fibrin eingeschlossen werden. Die gewaschene obere Schicht war in einer größeren Zahl von Fällen imstande Gerinnung des Fluoridplasmas herbeizuführen, aber öfters nur, wenn diese Zellen in großem Überschuß zu dem Fluoridplasma zugefügt wurden, oder wenn eine kleine Quantität Calciumchlorid zugesetzt wurde. Calciumchlorid begünstigte auch in mehreren Fällen die gerinnungserregende Wirkung der gewaschenen unteren Schicht. Zusatz einer sehr geringen Menge einer $^{n}/_{10}$-$CaCl_2$-Lösung zu Gewebsextrakt oder Serum hemmte hingegen deren Wirkung auf $^{n}/_{10}$-KF-Plasma, auch dann wenn die zugesetzte $CaCl_2$-Lösung nur einem geringen Bruchteil des in dem Gemisch enthaltenen Kaliumfluorids entsprach.*)

Bei den nicht gleichmäßigen Ergebnissen der über die Wirkung von Blutkörperchen auf Fluoridplasma angestellten Versuche war an die Möglichkeit zu denken, daß sie durch Bakterienwirkung kompliziert sein könnten. Schon in meinen früheren Versuchen

*) Morawitz nimmt an, daß das Calcium erst von Bedeutung werde, nachdem das Extrakt das Thrombogen aktiviert hat. Danach ließe sich erwarten, daß Bindung des Ca durch Zusatz von $^{n}/_{10}$-KF nach vorheriger Mischung von Serum und Extrakt von geringerer Wirkung sei, als wenn dieselbe Menge KF in zwei Teile geteilt vor der Mischung dem Serum und dem Extrakt gesondert zugesetzt wird. Es wurden dementsprechend in einer Reihe von Versuchen zu 0,5 ccm Serum und zu 0,5 ccm Leberextrakt vor und nach der Mischung wechselnde Mengen (0,3 ccm bis 1 ccm $^{n}/_{10}$ KF) zugefügt. KF wirkte mehrere Minuten ein, bevor die Mischung vorgenommen wurde; oder falls es der Mischung zugesetzt worden war, wurde mehrere Minuten gewartet, bevor das Fluoridplasma (1 ccm in jedem Falle) zugefügt wurde. Es ergab sich nun, daß ein irgendwie konstanter Unterschied je nach dem Zeitpunkt, in der die KF-Lösung zugesetzt wurde, nicht vorhanden war. Bald erwies sich die Mischung als wirksamer, in der das Calcium erst gebunden worden war, nachdem Serum und Extrakt schon aufeinander gewirkt hatten, bald die andere. In den Versuchen, in denen die kleineren Quantitäten KF zugesetzt wurden, konnte der durch die Kombination von Serum und Extrakt bewirkte Gerinnungbeschleunigungszuwachs noch deutlich sein, wurden die größeren Quantitäten benutzt, so wurde er unmerklich. Durch Calciumfluorid wird das Ferment mit niedergerissen oder adsorbiert, nach Bordet (Annales de l'Institut Pasteur) auch das Fibrinogen.

hatte sich ergeben, daß gewisse Bakterien Koagulation des verdünnten Gänseplasmas bewirken, und daß die Wirkung verschiedener Bakterien verschieden stark ist. In den gewaschenen Blutkörperchen ließ sich durch im Verlauf des Versuches gemachte Abimpfungen die Anwesenheit von Bakterien nachweisen. Es wurde daher der Einfluß von Bakterien (Proteus, Subtilis, Vibrio Metschnikoff, Staphylococcus pyogenes aureus) auf Fluoridplasma, das in der oben angegebenen Weise mit Hilfe von Kalium- oder Natriumfluorid hergestellt war, geprüft. Es wurden 3—4 tägige und mehrere Monate alte Bouillonkulturen verwendet.

Wenn diese Bouillonkulturen in gleicher Menge dem Fluoridplasma zugesetzt wurden, so wirkten sie entweder nicht gerinnungsbeschleunigend oder sie wirkten schwächer als die Blutkörperchen.

Dennoch wäre es möglich, daß die Bakterien die Wirksamkeit der Blutkörperchen wenigstens indirekt beeinflussen. Immerhin ist es jedoch nach diesen Versuchen wahrscheinlich, daß die roten Blutkörperchen nicht nur auf Serum verstärkend wirken, sich also in diesem Falle wie Gewebsextrakte verhalten, sondern daß sie auch auf Gewebsextrakte verstärkend wirken, also sich wie Serum verhalten.

	Kombiniert mit Serum	Kombiniert mit Leberextrakt
Gewaschene obere Schicht	4 mal wirksam	3 mal wirksam
Gewaschene untere Schicht	13 mal wirksam, 1 mal unwirksam, 1 mal schwach wirksam	11 mal wirksam, 3 mal unwirksam
Nicht gewaschene obere Schicht	1 mal wirksam	1 mal wirksam
Nicht gewaschene untere Schicht	5 mal wirksam, 1 mal unwirksam	2 mal wirksam, 4 mal unwirksam

IV. Über die Gewebskoaguline in der Autolyse im Tierkörper unterliegenden Organen und bei Phosphorvergiftung; über die gerinnungsbeschleunigenden Substanzen im Blute mit Phosphor vergifteter Tiere.

Im Anschluß an die vergleichenden Untersuchungen über die Gewebskoaguline in den verschiedenen Organen wurde das Verhalten der Koaguline in pathologisch veränderten Geweben untersucht: es wurde insbesondere geprüft, ob durch



autolytische Prozesse im Tierkörper eine Abnahme der Koaguline bewirkt wird. Jakoby*) und Conradi**) fanden, daß bei der in vitro stattfindenden Autolyse gerinnungshemmende Substanzen gebildet werden. Bei der Niere konnte der letztgenannte Autor solche Substanzen jedoch nicht nachweisen. Die gerinnungshemmenden Substanzen fanden sich in der bei der Autolyse sich bildenden Flüssigkeit. Die noch nicht gelösten Substanzen fand Conradi stark gerinnungsbeschleunigend, falls Extrakte aus ihnen bereitet wurden. Conradi schließt daraus, daß die bei der Autolyse sich bildenden gerinnungshemmenden Substanzen leicht die Zellen durchdringen und in die umgebende Flüssigkeit geraten, daß aber die gerinnungsbeschleunigenden Substanzen in der Zelle zurückgehalten werden.

Es wurden 4 Hunden die Gefäße der rechten Niere unterbunden. Zu verschiedenen Zeiten nach der Operation wurden hierauf den Hunden beide Nieren entnommen und daraus in quantitativ gleicher Weise Extrakte bereitet. Regelmäßig wurden beide Nieren nach vorheriger Zerkleinerung mit 0,85proz. NaCl-Lösung ausgewaschen, um etwa vorhandene gerinnungshemmende Substanzen der nekrotischen Niere zu entfernen; in einem Versuche wurde das unterlassen. Zur Prüfung wurde Hundepeptonblut sowie in der früher angegebenen Weise hergestelltes Kalium- und Natriumfluoridplasma des Hundes benutzt. Die Extrakte wurden sowohl allein wie auch in Kombination mit Serum gegenüber Fluoridplasma geprüft.

1. Versuch: 23 Stunden nach Unterbindung. Die rechte Niere war von haemorrhagisch infiltrierten Stellen durchsetzt. Gegenüber Peptonblut war ein geringfügiger Unterschied zwischen der pathologischen und der Kontrollniere vorhanden, indem letztere in etwas kürzerer Zeit Gerinnung bewirkte. Gegen Fluorplasma verhielten sich beide Extrakte gleich, indem beide mit einer gleichen Menge Serum gemischt in einem Bruchteil einer Minute Gerinnung bewirkten. Die aus den haemorrhagisch infiltrierten Stellen der rechten Niere ausfließende Flüssigkeit hatte weder eine gerinnungsbeschleunigende noch eine gerinnungshemmende Wirkung auf Fluorplasma.

2. Versuch: 5 Tage nach der Unterbindung. In der rechten Niere wechselten anaemische und haemorrhagische nekrotische Stellen ab. Von beiden wurden gesondert Extrakte bereitet. Beide waren im Vergleich zur Kontrollniere Peptonblut gegenüber unwirksamer als die nekrotische

*) M. Jakoby, Über die fermentative Eiweißspaltung und Ammoniakbildung in der Leber. Zeitschr. f. physiol. Chemie 30, 1900.

**) H. Conradi, Über die Beziehung der Autolyse zur Blutgerinnung. Diese Beiträge 1, 1902.

Niere des ersten Versuches. Der Verlust an die Koagulation beschleunigenden Substanzen trat besonders bei starken Verdünnungen hervor. Normales Hundeserum hemmte die Wirkung der Extrakte der Kontroll- sowie der nekrotischen Niere Peptonblut gegenüber, besonders stark die der letzteren. Auf Kaliumfluoridplasma wirkte das Extrakt der nekrotischen Niere und besonders der haemorrhagische Teil viel weniger gerinnungsbeschleunigend als das Extrakt der normalen Niere. Der Verlust an gerinnungsbeschleunigender Substanz war hier beträchtlich stärker als im ersten Versuch.

3. Versuch: 7 Tage nach der Unterbindung. Tier stirbt in der Nacht. Am nächsten Morgen werden Extrakte aus beiden Nieren bereitet. Die rechte Niere bildet eine rotgelbe weiche nekrotische Masse. Gegenüber Peptonblut hat die Kontrollniere eine mehr als zehnmal stärker gerinnungsbeschleunigende Kraft. Gegenüber Natriumfluoridplasma ist Hundeserum in Kombination mit dem Extrakt der Kontrollniere um das vielfache wirksamer als in Verbindung mit der gleichen Menge Extrakt der nekrotischen Niere. Doch wirkt in Kombination mit Serum das Extrakt der nekrotischen Niere stärker als die gleiche Menge einer 0,85 proz. NaCl-Lösung in Kombination mit Serum. Eine hemmende Wirkung der Nierenextrakte läßt sich also nicht nachweisen.

4. Versuch: 10 Tage nach der Unterbindung. Es findet sich eine grauweiße nekrotische weiche Masse umhüllt von einer durch neugebildetes Bindegewebe verdickten Kapsel. In der nekrotischen Masse befinden sich einzelne dunkle Blutkoagula, die möglichst entfernt werden. Ein bedeutender Teil der Niere scheint resorbiert worden zu sein. Das Blut des Tieres gerinnt langsamer als normal. Die nekrotische Niere wirkt um das vielfache schwächer als die Kontrollniere, sowohl allein wie in Kombination mit Hundeserum.

(CNE = Extrakt der Kontrollniere. nNE = Extrakt der nekrotischen Niere. HS = Hundeserum. FP = NaF Plasma des Hundes. PB = Peptonblut des Hundes. NaCl = 0.85 proz. NaCl-Lösung.)

Mischung	Gerinnungszeit
1/4 ccm CNE + 1/4 ccm HS + 1/2 ccm FP	zwischen 1 und 1 1/2 Min. koaguliert.
1/4 „ nNE + 1/4 „ HS + 1/2 „ FP	nach 14 Minuten koaguliert, nach 1 Stunde noch nicht ganz koag.
1/2 „ CNE + 1/2 „ FP	in weniger als 3 Min. koaguliert.
1/2 „ nNE + 1/2 „ FP	nach 1 Stunde noch nicht koag., am nächsten Morgen teilweise koag.
1 „ CNE + 1 „ PB	nach 1 Minute koaguliert.
1 „ nNE + 1 „ PB	nach 5 1/2 Minuten koaguliert.

Die nekrotische Niere übt keine gerinnungshemmende Wirkung aus:

Mischung	Gerinnungszeit
1/2 ccm CNE + 1/2 ccm NaCl + 1 ccm PB	Nach 1 Min. 50 Sek. koaguliert.
1/2 „ CNE + 1/2 „ nNE + 1 „ PB	Nach 55 Sekunden koaguliert.

Es ergibt sich aus diesen Versuchen, daß bei im Körper stattfindenden autolytischen Prozessen, welche durch Unterbindung der Blutgefäße bewirkt werden, ein Verlust an Gewebskoagulinen in der Niere eintritt, der nach 1 und 5 Tagen noch gering, nach

7 und 10 Tagen aber sehr stark ist. Die Anwesenheit gerinnungshemmender Substanzen läßt sich hierbei nicht nachweisen.

Bei der Phosphorvergiftung *) finden, worauf besonders M. Jakoby**) hingewiesen hat, der Autolyse ähnliche Vorgänge in der Leber statt. Es wurden daher bei 5 mit Phosphor vergifteten Hunden (4 Hunde erhielten innerhalb 8 bis 10 Tagen 7 bis 8 mal 0,07 g Phosphor per os, ein Hund erhielt nur 3 mal diese Dosis; bei ihm war die Wirkung am stärksten) in allen Fällen die Leber, 2 mal die Niere und in einem Falle die Muskeln in quantitativ vergleichbarer Weise gegenüber Peptonblut und Fluoridplasma allein und in Kombination mit Blutserum geprüft. Kontrollextrakte normaler Organe wurden in jedem Falle frisch hergestellt. Es ergab sich hierbei keine irgendwie bemerkenswerte Abnahme der Gewebskoaguline, obwohl die Leber in allen Fällen die für Phosphorvergiftung charakteristischen Veränderungen zeigte.

Relativ kleine Variationen kamen manchmal zugunsten der Extrakte der Phosphortiere vor, in anderen Fällen zugunsten der normalen Extrakte. Der Zellabbau geht offenbar bei der Phosphorvergiftung nicht weit genug, um zu einer deutlichen Abnahme der Gewebskoaguline zu führen.

Wie Corin und Ansiaux***) gefunden haben, fehlt bei subakuter Phosphorvergiftung das Fibrinogen im Blut; sie fanden ferner, indem sie Alex. Schmidts Darstellungsmethode des Fibrinferments benutzten, daß das Blut phosphorvergifteter Hunde weder Ferment noch Proferment, wohl aber zymoplastische Substanz enthält. Eine gerinnungshemmende Substanz konnten sie nicht nachweisen.

Bei unseren Versuchen war im 1. und 5. Versuch das Blut völlig ungerinnbar. Im 2., 3. und 4. Fall gerann das Blut sehr langsam und die gebildete Fibrinmenge blieb sehr klein. Eine gerinnungshemmende Substanz ließ sich weder frisch aufgefangenem Blute noch Fluoridplasma gegenüber nachweisen. Auch Blut, das völlig ungerinnbar war, beschleunigte im Vergleich zu 0,85 proz. NaCl-Lösung stark die Gerinnung frischen Blutes; hierbei mögen vielleicht die zelligen Elemente des Blutes beteiligt sein.

*) Bei einigen meiner einschlägigen Versuche assistierte mir Herr Dr. H. R. Alburger in freundlicher Weise.

) M. Jakoby, Über die Beziehungen der Leber und Blutveränderungen bei Phosphorvergiftung. Zeitschrift f. physiol. Chemie **30, 1900.

***) Corin u. Ansiaux, Untersuchungen über Phosphorvergiftung, Vierteljahrschrift f. gerichtliche Medizin 1894.

Zusatz von Serum oder Gewebsextrakt oder einer Kombination beider führte in keinem Falle zu einer Fibrinausscheidung in dem Blut eines der fünf mit Phosphor vergifteten Hunde.

Gegenüber Fluoridplasma zeigte das nicht gerinnende Blut des 5. Hundes in den meisten Versuchen weder allein eine gerinnungsbeschleunigende Wirkung noch in Kombination mit Gewebsextrakt; nur in einigen Proben war möglicherweise noch eine Spur von Thrombin vorhanden. Im nichtgerinnenden Blute des ersten Hundes konnte Kaliumfluoridplasma gegenüber eine sehr schwache gerinnungserregende Wirkung nachgewiesen werden. In den 3 anderen Fällen, in denen eine schwache Gerinnung des Phosphorblutes stattfand, war die gerinnungserregende Wirkung des defibrinierten Phosphorblutes Fluoridplasma gegenüber viel stärker als in dem ersten und fünften Fall, aber es hatte doch in allen Fällen ein Verlust an gerinnungsbeschleunigenden Substanzen Fluoridplasma gegenüber stattgefunden, wobei sich dieser Verlust entweder zeigte, wenn das defibrinierte Blut allein dem Fluoridplasma zugefügt, oder aber erst, wenn eine Kombination von Extrakt und defibriniertem Blut gebraucht wurde. Wir sehen daher, daß der Verlust an Fibrinogen und an im Blut vorhandenen gerinnungsbeschleunigenden Substanzen ungefähr parallel geht, derart, daß, wenn ein völliger Verlust des Fibrinogens stattgefunden hat, auch ein vollständiger oder fast vollständiger Verlust des Fermentes oder seiner Vorstufe eintritt, und daß, wenn ein teilweiser Verlust des Fibrinogens stattfindet, auch nur ein teilweiser Verlust des Fermentes oder seiner Vorstufe statt hat.

Das Blut von 4 dieser Hunde wurde auch gegenüber Peptonblut untersucht, wobei das schwachgerinnende Blut geprüft wurde, nachdem das Fibrin entfernt war.*)

Während normales Serum in Kombination mit Extrakt eine hemmende Wirkung gegenüber Peptonblut ausübt, war eine solche hemmende Wirkung im Phosphorblut entweder merklich schwächer oder fehlte gänzlich. Es mußte hierbei allerdings die Möglichkeit erwogen werden, daß die Blutkörperchen des Phosphorblutes der gerinnungshemmenden Wirkung entgegenwirken könnten. Da jedoch der Unterschied auch dann vorhanden war, wenn dem normalen Kontrollserum viele Blutkörperchen beigemischt waren, so ist dies unwahrscheinlich, wenn auch nicht mit Sicherheit auszuschließen.

---

*) Die zur Verfügung stehende Zentrifuge gestattete ein Zentrifugieren des Blutes dieser Hunde zur Gewinnung von Plasma nicht.

In dem nicht gerinnenden, wie in dem nur unvollständig gerinnenden Blute der mit Phosphor vergifteten Hunde fand eine Agglutination der Blutplättchen statt; dies beweist, ebenso wie eine Anzahl in einer früheren Arbeit angeführter Fälle, daß die Agglutination der Blutplättchen nicht direkt von der Blutgerinnung abhängig ist*).

*) Virchows Archiv 176, 1904. (Montreal Medical Journal July 1903)

XXXIX.

Über die Einwirkung von Wasserstoffhyperoxyd auf Enzyme.

Von Dr. **A. J. J. Vandevelde** (Gent).

I.

Die Untersuchungen von Loew*) haben den Beweis geliefert, daß das Vermögen tierischer und pflanzlicher Gewebe und Flüssigkeiten Wasserstoffhyperoxyd in Sauerstoff und Wasser zu zersetzen, einem besonderen Fermente, der Katalase, zuzuschreiben ist. Daß die Enzyme, neben ihrer spezifischen Wirkung auch die Fähigkeit besitzen Wasserstoffhyperoxyd zu zerlegen, wie seit langem bekannt ist und von Jacobson**) genauer untersucht wurde, beruht auf der Anwesenheit von auf diesen Enzymen fixierter Katalase.

Von Jacobson wurde gefunden, daß das katalytische Vermögen nicht ohne gleichzeitige Schädigung der Fermentwirkung zerstört wird, so durch Erhitzen der wässerigen Auszüge, der getrockneten Substanz oder des gefällten Ferments, ferner auch durch Aussalzen mittelst Natriumsulfat, durch Zusatz von Kali, Salzsäure oder von kleinen Mengen von Blausäure, Cyanmethyl, salzsaurem Hydroxylamin und Natriumnitrit.

Man hat bis jetzt meines Wissens die Einwirkung von Wasserstoffhyperoxyd auf die Wirksamkeit der Enzyme noch nicht unter-

---

*) O. Loew, Catalase, a new enzyme of general occurence. Bull. Departm. Agric. Washington, 1900.

**) T. Jacobson, Über ungeformte Fermente. Inaug.-Diss. Berlin. 1891, 27 S.

sucht; nur ich hatte in früheren Untersuchungen*) über die Katalase hervorgehoben, daß das Wasserstoffhyperoxyd eine zerstörende Wirkung auf das katalytische Enzym ausübt.

Vor kurzem haben nun Bliss und Novy**) die Wirkung von Formaldehyd auf Enzyme untersucht und gefunden, daß er die spezifische Wirkung der Enzyme stark hemmt. Dieser Nachweis ist von Bedeutung; da durch Formaldehyd die Enzyme minder wirksam, und weiter, wie von Trillat***) und anderen mitgeteilt wurde, die Eiweißkörper minder angreifbar werden, so erscheint er in bestimmten Fällen sehr wenig zur Sterilisierung z. B. der Milch geeignet; dagegen haben meine Untersuchungen mit De Waele und Sugg†) über die Wirkung von Wasserstoffhyperoxyd in der Milch zu der Schlußfolgerung geführt, daß dieser Stoff die Wirkung der proteolytischen Enzyme sehr beschleunigt. Diese Ergebnisse haben mich veranlaßt, den Einfluß von Wasserstoffhyperoxyd auf verschiedene Enzyme zu untersuchen, und zwar auf Labferment, Pepsin, Trypsin und auf diastatische Fermente.

Die Enzymlösung wurde in Probierröhrchen mit 10 ccm verschieden verdünnter Wasserstoffhyperoxydlösung zusammengebracht, das Totalvolum der Flüssigkeit auf 25 ccm ergänzt. Die Hyperoxydlösung selbst war aus dem reinen Produkt von Merck von 30 Proz. bereitet und mit Wasser auf 2,5 g in 100 ccm verdünnt; benutzt wurden Konzentrationen von 1, 0,5, 0,2, 0,1 und 0,05 Proz. der Gesamtflüssigkeit; die hyperoxydhaltenden Enzymlösungen wurden vor der Einbringung der von den Fermenten angreifbaren Stoffe 2 Stunden bei 35° gehalten.

II. Labferment.

Das Labferment wurde aus Kalbsmagenschleimhaut bereitet; nach 24stündiger Behandlung mit 0,15proz. HCl wurde der Auszug abfiltriert, mit $^{1}/_{10}$ n-Natronlauge neutralisiert, endlich mit einem gleichen Volum Glyzerin versetzt.

---

*) A. J. J. Vandevelde, H. Schoenfeld u. G. Leboucq, Over de verspreiding van de catalase in het menschelijk lichaam. 5. Vl. Nat. en Geneesk. Congres, Brugge, 1901.

A. J. J. Vandevelde u. G. Leboucq, Nieuwe onderzoekingen over de catalase-reactie in physiologische vochten. 7. Vl. Nat. en Geneesk. Congres, Gent, 1903.

**) C. L. Bliss u. F. G. Novy, Action of formaldehyde on enzymes and on certain proteids. The Journ. of experim. Medic., New-York 4, 47 bis 80 (1899).

***) Ann. Soc. biol., 1904.

†) H. De Waele, E. Sugg u. A. J. J. Vandevelde, Sur l'obtention du lait crû stérile. Centr. für Bakt., 2. Abt. 11, 1904.

A. J. J. Vandevelde, H. De Waele u. E. Sugg, Über die proteolytischen Fermente der Milch. Vergleiche die nachfolgende Abhandlung.

Von diesem Präparat, welches man mehrere Tage verwenden kann, wurden je 5 ccm während 2 Stunden mit 10 ccm Hyperoxydlösung von verschiedenen Konzentrationen zusammengebracht und dann nach 2 Stunden die Wirkung auf 10 ccm frische Vollmilch geprüft. Die Temperatur der Proben nach der Mischung mit Milch war 18° C.

H_2O_2 Proz.	ccm H_2O_2-Lösung	ccm Wasser	Beginn der Gerinnung nach Stunden			
			mit 0,5 ccm Lab und 4,5 ccm Wasser	mit 1 ccm Lab und 4 ccm Wasser	mit 2 ccm Lab und 3 ccm Wasser	mit 3 ccm Lab und 2 ccm Wasser
1	10	0	7 St. 30 M.	3 St.	1 St. 55 M.	1 St. 45 M.
0,5	5	5	12 St.	3 St. 30 M.	2 St. 45 M.	2 St. 45 M.
0,2	2	8	10 St. 5 M.	4 St. 15 M.	3 St. 15 M.	3 St. 15 M.
0,1	1	9	14 St.	4 St.	6 St. 20 M.	3 St. 45 M.
0,05	0,5	9,5	13 St.	7 St. 30 M.	12 St. 30 M.	6 St.
0	0	10	14 St. 30 M.	14 St.	14 St.	12 St.

Es folgt daraus, daß selbst geringe Mengen von Wasserstoffhyperoxyd die Wirkung des Labfermentes begünstigen; diese Beschleunigung ist bei den höchsten Konzentrationen der Labfermentlösung am meisten ausgesprochen, und stimmt ganz gut zu den Ergebnissen von L. Meunier*), welcher gezeigt hat, daß Zusatz von Labferment zu Milch deren Verdauung begünstigt.

III. Pepsin.

Die Wirkung des Pepsins wurde mit 0,2 proz. Auflösungen des käuflichen Produktes untersucht; je 10 ccm dieser Auflösung und 10 ccm Wasserstoffhyperoxyd wurden mit 5 ccm Wasser, 5 ccm 1 proz. Salzsäure oder 5 ccm 1 proz. Na_2CO_3-Lösung versetzt. Die Versuche mit H_2O- oder Na_2CO_3-Zusatz dienten dazu, die Wirkung des H_2O_2 auch unter dem Pepsin ungünstigen Bedingungen festzustellen.

In die Fermentlösungen wurde nun Eiweiß hineingebracht, und zwar: rohes und gekochtes Blutfibrin, gekochtes Ovalbumin, frischer feuchter Kleber, bei 100° C getrockneter Kleber, und auch eiweißreiche Teigwaren, nämlich Makkaroni. Der Zustand dieser als kleine Stückchen von gleicher Größe benutzten Substanzen wurde nach bestimmten Zeiträumen untersucht, und auch die Lage (in den Tabellen mit „oben" und „unten" angedeutet) in der Flüssigkeitssäule berücksichtigt. Die Versuchstemperatur war 35° C.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengefaßt.

*) Sur la digestion du lait et la signification du ferment du Lab. Bull. gen. de Therap., 147, 683 (1904).

A. Pepsin und rohes Fibrin.

10 ccm Enzymlösung + 10 ccm (H_2O_2 + H_2O) + 5 ccm H_2O, HCl oder Na_2CO_3.

Zusatz von 5 ccm	H_2O_2 Proz.	Zustand nach Stunden					
		2	12	24	36	48	72
H_2O	1	oben	gequollen	←	←	←	Nicht aufgelöst
	0,5	oben	gequollen	←	←	←	
	0,2	oben	←	gequollen	←	←	
	0,1	oben	←	gequollen	←	←	
	0,05	oben	←	gequollen	←	←	
	0	unten	←	gequollen	←	←	
HCl	1	ob.,gequoll.	aufgelöst	—	—	—	—
	0,5	ob.,gequoll.	aufgelöst	—	—	—	—
	0,2	ob.,gequoll.	aufgelöst	—	—	—	—
	0,1	ob.,gequoll.	unten	aufgelöst	—	—	-
	0,05	ob.,gequoll.	unten	aufgelöst	—	—	—
	0	unt.,gequol.	←	aufgelöst	—	—	—
Na_2CO_3	1	oben	gequollen	←	←	←	Nicht aufgelöst
	0,5	oben	←	←	gequollen	←	
	0,2	oben	←	←	gequollen	unten	
	0,1	oben	←	←	unten	←	
	0,05	oben	←	←	←	unten	
	0	oben	←	unten	←	←	

B. Pepsin und gekochtes Fibrin.

10 ccm Enzymlösung + 10 ccm (H_2O_2 + H_2O) + 5 ccm H_2O, HCl oder Na_2CO_3.

Zusatz von 5 ccm	H_2O_2 Proz.	Zustand nach Stunden.					
		2	12	24	36	48	72
H_2O	1	unten	ob. gequoll.	←	unten	oben	unt., nicht aufgel.
	0,5	oben	gequollen	←	←	←	nicht aufgelöst
	0,2	unten	oben	←	unten	←	ob., nicht aufgel.
	0,1	oben	←	←	←	←	nicht aufgelöst
	0,05	oben	←	←	←	←	nicht aufgelöst
	0	oben	unten	oben	unten	oben	nicht aufgelöst
HCl	1	ob.,gequoll.	unt.,gequol.	aufgelöst	—	—	—
	0,5	ob.,gequoll.	unt.,gequol	aufgelöst	—	—	—
	0,2	ob.,gequoll.	unt.,gequol.	aufgelöst	—	—	—
	0,1	ob.,gequoll.	←	aufgelöst	—	—	—
	0,05	unt.,gequol.	←	←	←	aufgelöst	—
	0	unt.,gequol	←	←	←	←	—
Na_2CO_3	1	oben	←	unten	gequollen	←	nicht aufgelöst
	0,5	unten	←	←	←	←	nicht aufgelöst
	0,2	oben	←	←	←	←	nicht aufgelöst
	0,1	oben	←	←	←	unten	nicht aufgelöst
	0,05	oben	←	←	←	←	nicht aufgelöst
	0	oben	←	unten	←	←	nicht aufgelöst

C. Pepsin und Ovalbumin.

10 ccm Enzymlösung + 10 ccm (H_2O_2 + H_2O) + 5 ccm H_2O, HCl oder Na_2CO_3.

Zusatz von 5 ccm	H_2O_2 Proz.	Zustand nach Stunden					
		2	12	24	36	48	72
H_2O	1	unten	oben	←	unten	oben	nicht aufgelöst
	0,5	unten	←	←	←	←	nicht aufgelöst
	0,2	unten	←	←	←	←	nicht aufgelöst
	0,1	unten	←	←	←	←	nicht aufgelöst
	0,05	unten	←	←	←	←	nicht aufgelöst
	0	unten	←	←	←	←	nicht aufgelöst
HCl	1	unten	angegriffen	aufgelöst	—	—	—
	0,5	unten	angegriffen	aufgelöst	—	—	—
	0,2	unten	angegriffen	aufgelöst	—	—	—
	0,1	unten	angegriffen	aufgelöst	—	—	—
	0,05	unten	angegriffen	aufgelöst	—	—	—
	0	unten	←	angegriffen	aufgelöst	—	—
Na_2CO_3	1	oben	←	unten	←	←	nicht aufgelöst
	0,5	unten	oben	unten	←	←	nicht aufgelöst
	0,2	unten	←	←	←	←	nicht aufgelöst
	0,1	unten	←	←	←	←	nicht aufgelöst
	0,05	unten	←	←	←	←	nicht aufgelöst
	0	unten	←	←	←	←	nicht aufgelöst

D. Pepsin und feuchter Kleber.

10 ccm Enzymlösung + 10 ccm (H_2O_2 + H_2O) + 5 ccm H_2O, HCl oder Na_2CO_3.

Zusatz von 5 ccm	H_2O_2 Proz.	Zustand nach Stunden					
		2	12	24	36	48	72
H_2O	1	oben	gequollen	←	←	←	aufgelöst
	0,5	oben	gequollen	←	←	←	aufgelöst
	0,2	oben	gequollen	←	←	←	nicht aufgelöst
	0,1	oben	gequollen	←	←	←	unt., nicht aufgel
	0,05	oben	←	←	←	←	nicht aufgelöst
	0	unten	←	←	oben	←	nicht aufgelöst
HCl	1	oben	unt.,angegr	←	aufgelöst	—	—
	0,5	oben	unt.,angegr	←	←	aufgelöst	—
	0,2	oben	unt.,angegr.	←	←	aufgelöst	—
	0,1	oben	unt.,angegr.	←	←	aufgelöst	—
	0,05	unten	angegriffen	←	←	aufgelöst	—
	0	unten	angegriffen	←	←	aufgelöst	—
Na_2CO_3	1	oben	angegriffen	←	←	←	aufgelöst
	0,5	oben	angegriffen	←	←	←	aufgelöst
	0,2	oben	angegriffen	←	←	←	nicht aufgelöst (aufgel.nach 96 St.)
	0,1	oben	angegriffen	←	←	unten	nicht aufgelöst (aufgel.nach 96 St.)
	0,05	oben	angegriffen	←	←	unten	nicht aufgelöst (aufgel. n. 144 St.)
	0	unten	angegriffen	←	←	←	nicht aufgelöst (aufgel. n. 240 St.)

E. Pepsin und getrockneter Kleber.

10 ccm Enzymlösung + 10 ccm ($H_2O_2 + H_2O$) + 5 ccm H_2O, HCl oder Na_2CO_3.

Zusatz von 5 ccm	Konz. H_2O_2	Zustand nach Stunden					
		2	12	24	36	48	72
H_2O	1	oben	←	←	←	←	gequollen, nicht aufgelöst
	0,5	oben	←	←	←	←	unten, gequollen, nicht aufgelöst
	0,2	oben	←	unten	←	←	gequollen, nicht aufgelöst
	0,1	unten	oben	←	←	←	unten, nicht gequollen
	0,05	unten	oben	←	←	←	nicht gequollen
	0	oben	←	unten	oben	unten	nicht gequollen
HCl	1	oben	←	←	angegriffen	unten	aufgelöst
	0,5	unten	oben	←	unten	angegriffen	aufgelöst
	0,2	unten	←	oben	unten	angegriffen	nicht aufgelöst (aufgel. nach 96 St.)
	0,1	oben	←	unten	←	angegriffen	nicht aufgelöst (aufgel. nach 96 St.)
	0,05	unten	←	oben	←	angegriffen	nicht aufgelöst (aufgel. nach 96 St.)
	0	oben	←	←	←	angegriffen	nicht aufgelöst (aufgel. nach 96 St.)
Na_2CO_3	1	oben	←	←	←	unten	nicht angegriffen
	0,5	oben	←	←	←	←	unt., nicht angegr.
	0,2	oben	←	←	←	←	unt., nicht angegr.
	0,1	oben	←	←	←	←	unt., nicht angegr.
	0,05	oben	←	←	←	←	unt., nicht angegr.
	0	unten	←	←	←	←	nicht angegriffen

F. Pepsin und Teig.

10 ccm Enzymlösung + 10 ccm ($H_2O_2 + H_2O$) + 5 ccm H_2O, HCl oder Na_2CO_3.

Zusatz von 5 ccm	H_2O_2 Proz.	Zustand nach Stunden.					
		2	12	24	36	48	72
H_2O	1	unten	ob., gequoll.	←	angegriffen	←	aufgelöst
	0,5	oben	gequollen	←	←	angegriffen	nicht aufgelöst
	0,2	oben	←	gequollen	←	unten	nicht angegriffen
	0,1	oben	←	unt., gequol	←	←	nicht angegriffen
	0,05	oben	←	gequollen	←	unten	nicht angegriffen
	0	unten	←	ob., gequoll.	unten	←	nicht angegriffen
HCl	1	unten	aufgelöst	—	—	—	—
	0,5	unten	angegriffen	aufgelöst	—	—	—
	0,2	unten	angegriffen	aufgelöst	—	—	—
	0,1	unten	angegriffen	aufgelöst	—	—	—
	0,05	unten	angegriffen	aufgelöst	—	—	—
	0	unten	angegriffen	aufgelöst	—	—	—
Na_2CO_3	1	oben	angegriffen	←	←	unten	aufgelöst
	0,5	oben	angegriffen	←	←	unten	aufgelöst
	0,2	oben	angegriffen	←	←	unten	nicht aufgelöst
	0,1	oben	←	unt., angegr.	←	←	nicht aufgelöst
	0,05	unten	oben	unt., gequol	←	angegriffen	nicht aufgelöst
	0	unten	←	←	←	gequollen	nicht aufgelöst

Behandlung mit Wasserstoffhyperoxyd macht die Pepsinlösung in saurer Lösung wirksamer; bei feuchtem Kleber und Teig konnte eine Auflösung ohne HCl nur bei den höheren Konzentrationen des Hyperoxyds beobachtet werden.

Es wurde ferner untersucht, ob bei Anwesenheit von Katalase die Geschwindigkeit der Auflösung des gekochten Fibrins und Ovalbumins, welche durch Kochen das katalytische Vermögen verlieren, und dabei auch eine höhere Molekularzusammensetzung erlangen, beschleunigt werde. Zu diesem Zwecke wurden die Flüssigkeiten mit 0,1 ccm Blutlösung (1 ccm frischem Rinderblut und 4 ccm Wasser) versetzt. Die gefundenen Ergebnisse stimmten ganz mit jenen überein, welche ohne Katalase erhalten wurden.

IV. Trypsin.

Die Versuche mit Trypsin waren in ganz gleicher Weise angeordnet wie die mit Pepsin. Es wurden Auflösungen von käuflichen Pankreatin (Denaeyer) von 0,2 Proz. benutzt, mit H_2O, HCl oder Na_2CO_3 versetzt. Die ungünstigen Bedingungen für das Ferment waren hier bei Anwesenheit von HCl verwirklicht.

Als Untersuchungsmaterial dienten rohes und gekochtes Blutfibrin, gekochtes Albumin, frischer feuchter Kleber, getrockneter Kleber, endlich Teigwaren; die Versuchstemperatur war 35° C.

A. Pankreatin und rohes Fibrin.

10 ccm Enzymlösung + 10 ccm (H_2O_2 + H_2O) + 5 ccm H_2O, HCl oder Na_2CO_3.

Zusatz von 5 ccm	H_2O_2 Proz.	Zustand nach Stunden					
		2	12	24	36	48	72
H_2O	1	oben	gequollen	angegriffen	←	aufgelöst	—
	0,5	oben	←	gequollen, angegriffen	←	aufgelöst	—
	0,2	oben	←	←	←	←	nicht aufgelöst (aufgel. n. 120 St.)
	0,1	oben	←	←	←	←	nicht aufgelöst (aufgel. n. 120 St.)
	0,05	oben	←	←	←	←	nicht aufgelöst (aufgel. n. 120 St.)
	0	unten	←	←	←	←	nicht aufgelöst
HCl	1	ob., gequol.	←	←	←	←	nicht angegriffen
	0,5	ob., gequol.	←	←	←	←	nicht angegriffen
	0,2	ob., gequol.	←	←	←	←	nicht angegriffen
	0,1	ob., gequol.	←	←	←	←	nicht angegriffen
	0,05	unt.,gequol.	←	oben	←	←	nicht angegriffen
	0	unt.,gequol.	oben	←	unten	←	nicht angegriffen
Na_2CO_3	0	ob., gequol.	←	angegriffen	←	aufgelöst	—
	0,5	ob., gequol.	←	angegriffen	←	aufgelöst	—
	0,2	ob., gequol.	←	angegriffen	unten	aufgelöst	—
	0,1	ob., gequol.	←	←	angegriffen	aufgelöst	—
	0,05	oben	gequollen	unten	angegriffen	aufgelöst	—
	0	unten	gequollen	←	angegriffen	aufgelöst	—

B. Pankreatin und gekochtes Fibrin.

10 ccm Enzymlösung + 10 ccm ($H_2O_2 + H_2O$) + 5 ccm H_2O, HCl oder Na_2CO_3.

Zusatz von 5 ccm	H_2O_2 Proz.	Zustand nach Stunden					
		2	12	24	36	48	72
H_2O	1	oben	gequollen	angegriffen	←	aufgelöst	—
	0,5	oben	←	gequollen	angegriffen	unten	nicht aufgelöst (aufgel. n. 120 St.)
	0,2	oben	←	←	←	←	nicht aufgelöst (aufgel. n. 120 St.)
	0,1	oben	←	←	←	←	nicht aufgelöst (aufgel. n. 120 St.)
	0,05	oben	←	←	←	←	nicht aufgelöst
	0	oben	←	←	←	←	nicht aufgelöst
HCl	1	ob., gequoll.	←	←	←	←	nicht angegriffen
	0,5	ob., gequoll.	←	←	←	←	nicht angegriffen
	0,2	ob., gequoll.	←	←	←	←	nicht angegriffen
	0,1	oben	gequollen	←	←	←	nicht angegriffen
	0,05	oben	←	gequollen	←	←	nicht angegriffen
	0	unten	←	gequollen	←	←	nicht angegriffen
Na_2CO_3	1	oben	gequollen	angegriffen	←	aufgelöst	—
	0,5	oben	gequollen	angegriffen	←	aufgelöst	—
	0,2	oben	gequollen	←	angegriffen	←	nicht aufgelöst (aufgel. n. 120 St.)
	0,1	oben	←	←	gequollen	angegriffen	nicht aufgelöst (aufgel. n. 120 St.)
	0,05	unten	←	←	←	angegriffen	nicht aufgelöst (aufgel. n. 120 St.)
	0	oben	unten	←	←	angegriffen	nicht aufgelöst (aufgel. n. 144 St.)

C. Pankreatin und Ovalbumin.

10 ccm Enzymlösung + 10 ccm ($H_2O_2 + H_2O$) + 5 ccm H_2O, HCl oder Na_2CO_3.

Zusatz von 5 ccm	H_2O_2 Proz.	Zustand nach Stunden					
		2	12	24	36	48	72
H_2O	1	unten	←	angegriffen	←	aufgelöst	—
	0,5	unten	←	←	angegriffen	←	aufgelöst
	0,2	unten	←	←	←	angegriffen	nicht aufgelöst (aufgel. n. 120 St.)
	0,1	unten	←	←	←	angegriffen	nicht aufgelöst (aufgel. n. 120 St.)
	0,05	unten	←	←	←	angegriffen	nicht aufgelöst (aufgel. n. 120 St.)
	0	unten	←	←	←	←	nicht aufgelöst (aufgel. n. 120 St.)
HCl	1	unten	←	←	←	←	nicht angegriffen
	0,5	unten	←	←	←	←	nicht angegriffen
	0,2	unten	←	←	←	←	nicht angegriffen
	0,1	unten	←	←	←	←	nicht angegriffen
	0,05	unten	←	←	←	←	nicht angegriffen
	0	unten	←	←	←	←	nicht angegriffen
Na_2CO_3	1	unten	←	angegriffen	←	aufgelöst	—
	0,5	unten	←	←	angegriffen	aufgelöst	—
	0,2	unten	←	←	←	angegriffen	aufgelöst
	0,1	unten	←	←	←	angegriffen	nicht aufgelöst (aufgel. n. 120 St.)
	0,05	unten	←	←	←	angegriffen	nicht aufgelöst (aufgel. n. 120 St.)
	0	unten	←	←	←	angegriffen	nicht aufgelöst (aufgel. n. 120 St.)

D. Pankreatin und feuchter Kleber.

10 ccm Enzymlösung + 10 ccm ($H_2O_2 + H_2O$) + 5 ccm H_2O, HCl oder Na_2CO_3.

Zusatz von 5 ccm	H_2O_2 Proz.	Zustand nach Stunden					
		2	12	24	36	48	72
H_2O	1	oben	unten	angegriffen	←	←	aufgelöst
	0,5	oben	unten	angegriffen	←	←	aufgelöst
	0,2	oben	unten	←	angegriffen	←	aufgelöst
	0,1	oben	←	unten	angegriffen	←	aufgelöst
	0,05	oben	←	←	angegriffen	←	nicht aufgelöst, verdorben
	0	unten	←	←	angegriffen	←	nicht aufgelöst, verdorben
HCl	1	oben	gequollen	←	←	←	angegriffen, nicht aufgelöst
	0,5	oben	gequollen	←	←	←	angegriffen, nicht aufgelöst
	0,2	oben	gequollen	←	←	←	nicht angegriffen
	0,1	oben	gequollen	←	unten	←	nicht angegriffen
	0,05	oben	gequollen	←	←	←	nicht angegriffen
	0	unten	←	←	←	←	nicht angegriffen
Na_2CO_3	1	oben	unt. angegr.	←	←	aufgelöst	—
	0,5	oben	unt. angegr.	←	←	aufgelöst	—
	0,2	oben	unt. angegr.	←	←	aufgelöst	—
	0,1	oben	unt. angegr.	←	←	aufgelöst	—
	0,05	unten	angegriffen	←	←	aufgelöst	—
	0	unten	angegriffen	←	←	←	nicht aufgelöst, verdorben

E. Pankreatin und getrockneter Kleber.

10 ccm Enzymlösung + 10 ccm ($H_2O_2 + H_2O$) + 5 ccm H_2O, HCl oder Na_2CO_3.

Zusatz von 5 ccm	H_2O_2 Proz.	Zustand nach Stunden.					
		2	12	24	36	48	72
H_2O	1	unten	oben	←	←	angegriffen	nicht aufgelöst
	0,5	oben		←	←	angegriffen	nicht aufgelöst
	0,2	unten	oben	←	←	angegriffen	nicht aufgelöst
	0,1	oben	←	←	←	angegriffen	nicht aufgelöst
	0,05	unten	←	←	←	←	nicht aufgelöst, verdorben
	0	unten	←	oben	←	←	nicht aufgelöst, verdorben
HCl	1	oben	gequollen	←	←	←	nicht angegriffen
	0,5	unten	ob., gequoll	←	←	←	nicht angegriffen
	0,2	oben	gequollen	←	←	unten	nicht angegriffen
	0,1	unten	oben	unten	←	←	nicht angegriffen
	0,05	unten	←	←	oben	unten	nicht angegriffen
	0	unten	←	←	←	←	nicht angegriffen
Na_2CO_3	1	oben	unt., angegr.	←	←	←	aufgelöst
	0,5	oben	angegriffen	←	←	←	nicht aufgelöst (aufgel. n. 96 St.)
	0,2	oben	←	←	←	angegriffen	nicht aufgelöst (aufgel. n. 120 St.)
	0,1	oben	←	←	←	angegriffen	nicht aufgelöst (aufgel. n. 168 St.)
	0,05	oben	←	←	←	angegriffen	nicht aufgelöst (aufgel. n. 168 St.)
	0	unten	←	←	←	angegriffen	nicht aufgelöst, verdorben

F. Pankreatin und Teig.

10 ccm Enzymlösung + 10 ccm (H_2O_2 + H_2O) + 5 ccm H_2O, HCl oder Na_2CO_3.

Zusatz von 5 ccm	H_2O_2 Proz.	Zustand nach Stunden					
		2	12	24	36	48	72
H_2O	1	ob., angegr.	unten	aufgelöst	—	—	—
	0,5	ob., angegr.	unten	aufgelöst	—	—	—
	0,2	oben	unt., angegr.	←	aufgelöst	—	—
	0,1	oben	unten	angegriffen	aufgelöst	—	—
	0,05	unten	angegriffen	←	aufgelöst	—	—
	0	unten	angegriffen	←	aufgelöst	—	—
HCl	1	unten	←	angegriffen	aufgelöst	—	—
	0,5	unten	←	angegriffen	←	aufgelöst	—
	0,2	unten	←	angegriffen	←	←	nicht aufgelöst
	0,1	unten	←	←	←	←	nicht aufgelöst
	0,05	unten	←	←	←	←	nicht aufgelöst
	0	unten	←	←	←	←	nicht aufgelöst
Na_2CO_3	1	ob., angegr.	aufgelöst	—	—	—	—
	0,5	ob., angegr.	aufgelöst	—	—	—	—
	0,2	unten	angegriffen	aufgelöst	—	—	—
	0,1	oben	unt., angegr.	aufgelöst	—	—	—
	0,05	unten	angegriffen	←	aufgelöst	—	—
	0	unten	angegriffen	aufgelöst	—	—	—

Wie beim Pepsin wirkt Wasserstoffhyperoxyd auch beim Pankreatin günstig, jedoch gewöhnlich nur bei Zusatz von Na_2CO_3; ohne Na_2CO_3 bei rohem Fibrin, gekochtem Fibrin, Ovalbumin, feuchtem Kleber und Teig, und auch bei Zusatz von HCl zu Teig ist eine Beschleunigung der Auflösung, doch nur für höhere Konzentrationen zu konstatieren.

Ebenso wie für Pepsin wurde die Geschwindigkeit der Reaktion mit gekochtem Fibrin und Ovalbumin unter Zusatz von katalasehaltendem Blut untersucht, jedoch ohne Erfolg.

V. Diastatische Enzyme.

Von diastatisch wirkenden Präparaten wurden Malzextrakt, Malzamylase, Speichelptyalin und Pankreasdiastase (Amylopsin) und zwar in ihrer Einwirkung auf 10 ccm eines 2proz. Kartoffelmehlkleisters bei 18° C untersucht. Es wurden 5 ccm der Lösung der Enzyme und 10 ccm Wasserstoffhyperoxydlösung von verschiedener Konzentration benutzt und die Geschwindigkeit mit Hilfe der durch Jodjodkaliumlösung zu erzielenden Färbung bestimmt.

In den folgenden Tabellen wird die nach bestimmten Zeitintervallen auf Zusatz von einem Tropfen verdünnter Jodlösung eintretende Färbung angegeben.

A. Malzextrakt.

Das Malzextrakt wurde nach van Laer*) bereitet; das erhaltene Produkt war sehr wirksam.

100 g getrocknetes Darr-Gerstenmalz wurden mit Seesand in einem Mörser zerrieben und hierauf mit 450 ccm Wasser bei Zimmertemperatur unter öfterem Schütteln 24 Stunden gehalten. Nach Filtration ist die Flüssigkeit zum Versuch fertig; für länger dauernde Versuche wurde die Auflösung mit einigen Chloroformtropfen versetzt.

5 ccm Enzymlösung + 10 ccm (H_2O_2 + H_2O) + 10 ccm Stärkekleister.

H_2O_2 Proz.	Färbung nach Stunden.			
	1	3	5	7
1	blau	blau	hellblau	hellgelb
0,5	blau	blau	hellblau	hellgelb
0,2	blau	blau	hellblau	hellgelb
0,1	blau	hellgelb	—	—
0,05	blau	hellgelb	—	—
0	hellblau	hellgelb	—	—

Die größte Geschwindigkeit zeigen die Flüssigkeiten ohne oder mit geringem Zusatz von Wasserstoffhyperoxyd.

B. Malzamylase.

Ich habe käufliche, pulverförmige Diastase benutzt; die Wirksamkeit dieses Präparates war sehr gering, und die hemmende Wirkung des Hyperoxyds so bedeutend, daß schon bei einer Konzentration 0,05 Proz. H_2O_2, die Verzuckerung der Stärke nicht mehr stattfand. Die wässerige Lösung enthielt 0,4 g Amylase in 100 ccm.

5 ccm Enzymlösung + 10 ccm (H_2O_2 + H_2O) + 10 ccm Stärkekleister.

H_2O_2 Proz.	Färbung nach Stunden.			
	7	24	60	74
1	blau	blau	blau	blau
0,5	blau	blau	blau	blau
0,2	blau	blau	blau	blau
0,1	blau	blau	blau	blau
0,05	blau	blau	blau	blau
0	blau	hellgelb	—	—

C. Speichelptyalin.

Frischer Speichel wurde mit 2 Volumen Wasser verdünnt und die Flüssigkeit filtriert.

*) Bull. Surveill. derr. aliment., 1901, S. 290.

5 ccm Enzymlösung + 10 ccm ($H_2O_2 + H_2O$) + 10 ccm Stärkekleister.

H_2O_2 Proz.	Färbung nach Stunden.					
	1	3	24	36	60	84
1	blau	blau	blau	blau	hellblau	hellgelb
0,5	blau	blau	blau	blau	hellblau	hellgelb
0,2	blau	blau	blau	hellblau	hellgelb	—
0,1	blau	blau	blau	hellblau	hellgelb	—
0,05	blau	blau	blau	hellblau	hellgelb	—
0	blau	hellgelb	—	—	—	—

Die Wirkung des H_2O_2 erweist sich auch hier als sehr ungünstig; die hemmende Wirkung nimmt mit der Konzentration des Wasserstoffhyperoxyds zu.

D. Pankreasdiastase (Amylopsin).

Ich habe das diastatische Vermögen des käuflichen Pankreatins (Denaeyer) untersucht; es wurde eine wässerige Auflösung von 0,4 g in 100 ccm bereitet.

5 ccm Enzymlösung + 10 ccm ($H_2O_2 + H_2O$) + 10 ccm Stärkekleister.

H_2O_2 Proz.	Färbung nach Stunden.					
	7	24	36	60	84	120
1	blau	blau	blau	blau	blau	hellgelb
0,5	blau	blau	blau	blau	hellblau	hellgelb
0,2	blau	blau	blau	blau	hellblau	hellgelb
0,1	blau	blau	blau	hellgelb	—	—
0,05	blau	blau	blau	hellgelb	—	—
0	blau	hellblau	hellblau	hellgelb	—	—

Wie bei den drei anderen diastatischen Enzymen wirkt Wasserstoffhyperoxyd auch auf Pankreasdiastase stark verzögernd, und so kann gesagt werden, daß H_2O_2 auf die Verzuckerung der Stärke durch die Diastasen überhaupt eine hemmende Wirkung ausübt.

VI. Schlußfolgerungen.

Die Wirkung des Wasserstoffhyperoxyds auf die untersuchten Enzyme ist verschieden; beim Lab, Pepsin, Trypsin ferner, wie aus meinen Untersuchungen mit De Waele und Sugg*) zu entnehmen ist, bei den proteolytischen Fermenten der Milch, begünstigt es die Fermentwirkung und die erzielte Beschleunigung nimmt mit der Konzentration des Wasserstoffhyperoxyds zu. Diese Beschleunigung ist bei der Quellung, sowie bei der Auf-

*) Loc. cit.

lösung wahrnehmbar. Die Quellung entspricht gewöhnlich dem Beginn der Auflösung, leitet jedoch nicht immer eine solche ein. Da das Wasserstoffhyperoxyd unter sehr günstigen Bedingungen beim Pepsin und Trypsin meistens eine Erhöhung der Auflösungsgeschwindigkeit zur Folge hat, so ist hier eine kinasenähnliche Wirkung (Pawlow) nicht ausgeschlossen. Eine derartige Wirkung kommt der auf Albumin und Fibrin fixierten Katalase nicht zu. Die Lage der untersuchten Stückchen in den Flüssigkeitssäulen scheint von den Bedingungen der Untersuchungen unabhängig zu sein, und zeigt große Veränderlichkeit.

Auf das Loewsche katalytische Enzym übt Wasserstoffhyperoxyd, wie von Senter*) und von mir**) gefunden wurde, einen verzögernden Einfluß aus, ebenso auf die diastatischen Enzyme.

Eine zufriedenstellende Erklärung dieser Wirkungen geben zu wollen, etwa mit Hilfe der Labilitätstheorie von Loew***) und mit Hilfe der Entstehung von labilen Säuren durch Fixieren von H_2O_2 auf den Ketonketten†) der Enzymmoleküle, erscheint mir noch verfrüht.

---

*) G. Senter, Das Wasserstoffsuperoxyd zersetzende Enzym des Blutes, I. Zeitschr. f. physik. Chemie **44**, 257 (1903).

**) Loc. cit.

***) Chem. Centr. 1, 1435 (1904).

†) Von Hollemann wurde die Entstehung von Säuren aus Ketonen und H_2O_2 untersucht. Rec. trav.-chim. Pays-Bas Nr. 2, 1904.

Gent, Juli 1904.

XL.

Über proteolytische Enzyme der Milch.

Von Dr. A. J. J. Vandevelde, Dr. H. de Waele und
Dr. E. Sugg (Gent).

I.

Im Laufe unserer Untersuchungen*) zur Herstellung von steriler roher Milch durch Behandlung mit Wasserstoffhyperoxyd und nachträgliche Zersetzung desselben mit Katalase enthaltenden sterilen Flüssigkeiten haben wir unsere Aufmerksamkeit auf eventuelle Veränderungen der Milch gerichtet. Auf unsere Veranlassung wurde von Herrn Assistenten F. Leperre**) vergleichsweise der Einfluß von Wasserstoffhyperoxyd und Formol auf die chemische Zusammensetzung der Milch untersucht.

Es wurde der Beweis geliefert, daß die Zusammensetzung unverändert bleibt, mit Ausnahme des Kaseins und des Albumins, deren Menge durch Wasserstoffhyperoxyd, dagegen nicht durch Formol, eine Verminderung erleidet.

Diese Untersuchungen, auf deren Ergebnisse wir hier betreffs des Kaseins und Albumins bezugnehmen, wurden folgender Weise ausgeführt:

Je 200 ccm frischer Milch wurden in sterilisierten Erlenmeyerschen Kolben mit 50 ccm Wasser und reinem Wasserstoffhyperoxyd (Merck) versetzt, und nach bestimmten Zeiten wurden die Mengen des Kaseins und des Albumins festgestellt. Da etwa auftretende freie Säuren die Eiweißkörper aufzulösen vermögen, wurde auch die Wirkung von Wasserstoffhyperoxyd bei Anwesenheit von reinem, sterilem kohlensaurem Calcium untersucht.

---

*) H. de Waele, E. Sugg und A. J. J. Vandevelde, Sur l'obtention du lait crû stérile. Centr. Bakt., II. Abt., 1904.

**) Over den invloed van bederfwerende stoffen op de scheikundige samenstelling van de melk. 8. Vl. Nat. en Geneesk. Congres Antwerpen 1904.

Die Bestimmungen geschahen mit 20 oder 25 ccm Milch; diese wurden mit 25 ccm Wasser und 1 ccm 20proz. Essigsäure versetzt. Der Niederschlag, welcher sich nach etwa einer Stunde bei Laboratoriumtemperatur, oder höchstens bei 40° C abgesetzt hatte, wurde auf einem bei 110° getrockneten tarierten Filter gesammelt, mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen, wodurch das Milchfett vollständig entfernt wurde, wieder bei 110° getrocknet und endlich gewogen.

Das Albumin wurde aus dem Filtrat durch Kochen niedergeschlagen.

Die zentrifugierte Milch (C 109), welche untersucht wurde, hatte folgende prozentische Zusammensetzung:

Extrakt: 8,10 Proz., Asche: 0,67 Proz., Milchzucker: 3,30 Proz., Fett: 0,42 Proz., Kasein: 3,08 Proz., Albumin: 0,38 Proz.

Je 25 ccm der mit Wasser und H_2O_2 versetzten Milchproben wurden zur Bestimmung der Eiweißkörper benutzt und die gefundenen Mengen auf 100 ccm der ursprünglichen Milch (C 109) umgerechnet.

Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

H_2O_2	Zeit in	Milch	Wasser	H_2O_2(2,5 g in 100 ccm)	$CaCO_3$	In 100 ccm Milch C 109	
Proz.	Tagen	ccm	ccm	ccm	g	g Kasein	g Albumin
0	0	200	50	0	0	3,03	0,31
0	0	200	50	0	0	3,02	0,30
0,1	2	200	40	10	0	2,83	0,15
0,2	2	200	30	20	0	2,68	0,11
0,4	2	200	10	40	0	2,68	0,11
0,2	15	200	30	20	0	1,93	0,17
0,2	15	200	30	20	1	1,95	0,17
0,2	45	200	30	20	0	1,59	0,20
0,2	45	200	30	20	1	1,59	0,20

Somit war der Beweis erbracht, daß Wasserstoffhyperoxyd direkt oder indirekt das Vermögen hat, erhebliche Mengen von Kasein und Albumin in nichtkoagulable Eiweißkörper umzuwandeln.

Da nun unsere Untersuchungen*) ergeben haben, daß durch Wasserstoffhyperoxyd alle Bakterien vernichtet werden, ist ein Einfluß derselben ausgeschlossen. Weiter zeigte sich, daß das Wasserstoffhyperoxyd in der Kuhmilch spontan nie vollständig verschwindet; da aber, auch nach der Zersetzung des Wasserstoffhyperoxyds durch Katalase, die peptonisierende Wirkung auf die Eiweißkörper weitergeht, so war eine enzymatische Wirkung anzunehmen, und es war angezeigt, die Rolle des H_2O_2**) bei oder neben der Enzymwirkung näher zu bestimmen.

*) loc. cit.

**) A. J. J. Vandevelde, Über den Einfluß von Wasserstoffhyperoxyd auf Enzyme. Diese Beiträge 5, 558 (1904).

II.

Ein proteolytisches Ferment wurde in der Milch schon 1900 von Babcock und Russel*) gefunden und Galaktase genannt. Die betreffenden Untersuchungen waren mit Cheddarkäse ausgeführt und ergaben als eine Ursache des Reifwerdens die Umwandlung des Kaseins in nicht koagulable Proteide und zwar durch eine Umwandlung von enzymatischem Charakter. Die Galaktase sollte vom Trypsin verschieden sein. Später besprach Spolverini**) die proteolytischen Fermente in der Milch. Er machte (ohne nähere Angaben) keinen Unterschied gegenüber Trypsin. Die Untersuchungen von E. Moro***) wurden mit der Methode von Mett an koaguliertem Hühnereiweiß und mit der Methode von Bidder und Schmidt an abgewogenen, bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Fibrinflocken in alkalischer oder schwachsaurer (HCl) Flüssigkeit ausgeführt. Es ergab sich, daß 250 ccm Kuhmilch in schwach salzsaurer Lösung 0,0009 g einer zarten Fibrinflocke zur Auflösung brachten, während die gleiche Menge Menschenmilch nur einen Gewichtsverlust von 0,0006 g an der Fibrinflocke veranlaßte (Pepsin). Bei alkalischer Reaktion lösten 250 ccm Kuhmilch 0,0019 g, 250 ccm Frauenmilch 0,0013 g Fibrineiweiß auf (Trypsin).

Friedjung und Hecht†) untersuchten die Wirkung der proteolytischen Fermente nach der Methode von Fermi††); diese Untersucher erhielten durch Thymolzusatz die Milch bei genau amphoterer Reaktion; sie fanden, daß das proteolytische Enzym von geringer Wirkung ist, und da dieselbe schon bei amphoterer Reaktion hervortritt, so schließen sie, daß das Enzym von Pepsin und von Trypsin verschieden sein müsse.

Nach Neumann Wender*) ist das Enzym, welches als Galaktase bezeichnet wurde, kein einheitlicher Körper, sondern ein Gemenge mehrerer vergesellschaftet vorkommender Enzyme von

---

*) Galaktase, das der Milch eigentümliche Ferment. Centr. Bakt., II. Abt. 6, 22, 45 und 79 (1900).

**) Arch. de médec. des enfants, IV, 12. Dec. 1901; zitiert von E. Moro, Jahrb. für Kinderheilkunde 56, 392 (1902).

***) Über die Fermente der Milch. Jahrb. für Kinderheilkunde, N. F., 56, 392 bis 420 (1902).

†) Über Katalyse und Fermentwirkungen der Milch. Arch. für Kinderheilkunde 37, Heft 5/6.

††) Die Leimgelatine als Reagens zum Nachweis tryptischer Enzyme. Archiv f. Hygiene 12, 240.

†††) Die Enzyme der Milch. Oest. Chem.-Zeitg. Nr. 1, 1903.

proteolytischen Eigenschaften gegenüber Kasein. Er hält demnach die Galaktase nicht für ein besonderes Ferment.

Mit Hilfe von Wasserstoffhyperoxyd ist es uns gelungen, die proteolytischen Eigenschaften der Milch mit größerer Genauigkeit zu untersuchen. Das Wasserstoffhyperoxyd übt, wie von einem von uns*) bewiesen wurde, keine schädliche Wirkung auf proteolytische Fermente aus; außerdem waren die früheren Untersuchungen zum Teil bei Anwesenheit von Bakterien ausgeführt worden, welche gewiß die Resultate beeinflussen können, zum Teil bei Gegenwart von antiseptischen Stoffen (Thymol), die auf Enzyme im allgemeinen eine störende Wirkung ausüben.

III. Wirkung des Enzyms.

Je 100 ccm der Milch C109 (cf. Seite 572) wurden mit 12 ccm reinem 2,5proz. Wasserstoffhyperoxyd, was einer Konzentration von 0,3 g H_2O_2 in 100 ccm Gesamtflüssigkeit entspricht, und nach 30 Tagen mit 0,5 ccm einer katalysierenden Flüssigkeit versetzt, welche aus 1 Volumteil frischem Ochsenblut und 2 Volumteilen Wasser auf dieselbe Weise bereitet war, wie in unseren Untersuchungen über Milchsterilisierung**).

Eine Probe wurde 10 Tage nach der Katalysierung untersucht, eine zweite und dritte 15 Tage später; die letzte war während dieser 15 Tage bei 35° C gehalten worden.

1. Probe: (30 + 10 Tage, t = 18° C) 25 ccm der mit Wasserstoffhyperoxyd und Blut versetzten Milch:

Kasein: 0,3749 g, 0,3754 g } im Mittel 0,3752 g.
Albumin: 0,0515 g, 0,0472 g } im Mittel 0,0493 g.

Das heißt: In 100 ccm: 1,5008 g Kasein und 0,1972 g Albumin.

Die Berechnung für 100 ccm der nicht versetzten Milch ergibt:

Kasein: 1,6900 g,
Albumin: 0,2221 g.

Die Verminderung des Kaseins beträgt 3,03 — 1,69 = 1,34 g und des Albumins 0,31 — 0,22 = 0,09 g.

2. Probe: (30 + 25 Tage, t = 18° C), 25 ccm der mit Wasserstoffhyperoxyd und Blut versetzten Milch:

Kasein: 0,3700 g, 0,3693 g } im Mittel 0,3696 g.
Albumin: 0,0380 g, 0,0391 g } im Mittel 0,0386 g.

In 100 ccm: 1,4784 g Kasein und 0,1544 g Albumin.

Die Berechnung für 100 ccm der nicht versetzten Milch ergibt:

Kasein: 1,6648 g; Verminderung: 3,03 — 1,66 = 1,37 g.
Albumin: 0,1739 g; Verminderung: 0,31 — 0,17 = 0,14 g.

---

*) loc. cit. — **) loc. cit.

3. Probe: (30 + 25 Tage, Temp. während der 15 letzen Tage = 35° C): 25 ccm der mit Wasserstoffhyperoxyd und Blut versetzten Milch:

Kasein: 0,2853 g, 0,2773 g } im Mittel 0,2313 g.

Albumin: 0,0302 g, 0,0356 g } im Mittel 0,0327 g.

In 100 ccm: 1,1252 g Kasein und 0,1308 g Albumin.

Die Berechnung für 100 ccm der nicht versetzten Milch ergibt:

Kasein: 1,2670 g; Verminderung: 3,03 — 1,27 = 1,76 g.

Albumin: 0,1473 g; Verminderung: 0,31 — 0,15 = 0,16 g.

Die Verminderung des Kaseins in den 3 Proben beträgt 1,34, 1,37 und 1,76 Proz., die Verminderung des Albumins beträgt 0,09, 0,14 und 0,16 Proz. Da am 30. Tage in den 3 Proben das Wasserstoffhyperoxyd durch die Blutkatalase zersetzt worden war, ist von da ab eine Wirkung des Wasserstoffhyperoxyds ausgeschlossen.

Die normale, rohe, bakterien- und reagentienfreie Milch besitzt, wie diese Untersuchungen beweisen, das Vermögen, Kasein und Albumin zu peptonisieren; diese Selbstverdauung nimmt mit der Zeit und mit der Temperaturerhöhung zu. Dadurch ist die Anwesenheit eines proteolytischen Enzyms in der Milch festgestellt.

IV. Wirkung des Enzyms bei Anwesenheit von Wasserstoffhyperoxyd.

Um die Wirkung des Wasserstoffhyperoxyds und des Enzyms für sich zu bestimmen, wurden rohe Milch, gekochte Milch und Mischungen der beiden angewendet.

Die benutzte Vollmilch (V 113) enthielt in 100 ccm:

Extrakt: 10,83 g, Asche: 0,68 g, Milchzucker: 4,14 g, Fett: 2,83 g, Kasein: 3,34 g, Albumin: 0,27 g.

A. Frische, rohe Milch; 20 ccm Milch + 30 ccm Wasser gaben 0,6681 g Kasein und 0,0543 g Albumin;

in 100 ccm: Kasein: 3,3405, Albumin: 0,2715 } zusammen 3,6120

B. 20 ccm rohe Milch + 26 ccm Wasser + 4 ccm 2,5 proz. H_2O_2, 15 Tage bei 35° C:

In 20 ccm: 0,3303 g Kasein und 0,0301 g Albumin,

in 100 ccm: Kasein: 1,6515, Albumin: 0,1505 } zusammen 1,8020

$$\text{Verminderung: } \frac{1,8020 \times 100}{3,6120} = 50 \text{ Proz.; } 100 - 50 = 50 \text{ Proz.}$$

Die Ursachen der Verminderung sind hier das proteolytische Enzym und die eventuelle Wirkung des Wasserstoffhyperoxyds.

C. 20 ccm Milch im Wasserbade 30 Min. auf 99° C erwärmt, mit 30 ccm Wasser versetzt:

In 20 ccm: 0,7087 g Kasein und 0,0003 g Albumin*);

*) Die Benennungen Kasein und Albumin sind hier natürlich nicht genau. Da durch Kochen Albumin unlöslich wird, wird auch durch Essig-

in 100 ccm: Kasein: 3,5435 } zusammen 3,5450.
Albumin: 0,0015 }

D. 20 ccm im Wasserbade während 30 Min. auf 99° C erwärmter Milch + 26 ccm Wasser + 4 ccm 2,5 proz. H_2O_2, 15 Tage bei 35° C.

In 20 ccm: 0,5964 g Kasein und 0,0002 g Albumin,

in 100 ccm: Kasein: 2,9820 } zusammen 2,9830 g
Albumin: 0,0010 }

$$\text{Verminderung: } \frac{2{,}9830 \times 100}{3{,}5450} = 84 \text{ Proz.; } 100 - 84 = 16 \text{ Proz.}$$

Da durch Erwärmen das proteolytische Enzym vernichtet wird, ist die Verminderung nur dem Wasserstoffhyperoxyd zuzuschreiben.

E. 10 ccm rohe Milch + 10 ccm im Wasserbade während 30 Min. auf 99° C erwärmter Milch + 26 ccm Wasser + 4 ccm 2,5 proz. H_2O_2, 15 Tage bei 35° C:

In 20 ccm dieser Mischung (also 10 ccm roher und 10 ccm erwärmter Milch) wurden 0,4305 g Kasein und 0,0155 g Albumin gefunden.

In 100 ccm: Kasein: 2,1525 } zusammen 2,2300
Albumin: 0,0775 }

Die Verminderung beträgt (siehe A und C):

$$\frac{2{,}2300 \times 100}{\left(\frac{3{,}6120 + 3{,}5450}{2}\right) \text{ oder } 3{,}5785} = 62 \text{ Proz.; } 100 - 62 = 38 \text{ Proz.}$$

F. 20 ccm bis zum Kochen (Temp. = 101°.C) auf der Flamme in einem Erlenmeyerschen Kolben erwärmter Milch mit 30 ccm Wasser versetzt:

In 20 ccm: 0,7014 g Kasein und 0,0047 g Albumin;

in 100 ccm: Kasein: 3,5070 } zusammen 3,5305
Albumin: 0,0235 }

G. 20 ccm wie in F bis zum Kochen (t = 101° C) erwärmter Milch + 26 ccm Wasser + 4 ccm 2,5 proz. H_2O_2, 15 Tage bei 35° C:

in 20 ccm: 0,6088 g Kasein und 0,0004 g Albumin;

In 100 ccm: Kasein: 3,0440 } zusammen 3,0460
Albumin: 0,0020 }

$$\text{Verminderung: } \frac{3{,}0460 \times 100}{3{,}5305} = 86 \text{ Proz., } 100 - 86 = 14 \text{ Proz., also}$$

dieselben Ergebnisse, wie bei der Wirkung des H_2O_2 auf die auf dem Wasserbade erwärmte Milch (D).

H. 10 ccm rohe Milch + 10 ccm wie bei F auf 101° C. erwärmter Milch + 26 ccm Wasser + 4 ccm 2,5 proz. H_2O_2, 15 Tage bei 35° C:

In 20 ccm dieser Mischung von 10 ccm roher und 10 ccm gekochter Milch wurden gefunden: 0,4057 g Kasein und 0,0171 g Albumin.

In 100 ccm: Kasein: 2,0285 } zusammen 2,1140.
Albumin: 0,0855 }

Die Verminderung beträgt (siehe A und F):

$$\frac{2{,}1140 \times 100}{\frac{(3{,}6120 + 3{,}5305)}{2} \text{ oder } 3{,}5712} = 60 \text{ Proz., } 100 - 60 = 40 \text{ Proz.}$$

also dasselbe Ergebnis wie bei der Wirkung des H_2O_2 auf die im Wasserbade erwärmte Milch (E).

---

säure das Albumin mit dem Kasein gefällt. Hier bedeutet demnach Kasein die Eiweißkörper, welche mit verdünnter Essigsäure unterhalb 40°, und Albumin die, welche beim Erhitzen ausfallen.

Wir fanden demnach zweimal, unter verschiedenen Temperaturbedingungen, nahezu dieselben Werte, nämlich 16 Proz. und 14 Proz. bei D und G, und 38 Proz. und 40 Proz. bei E und H. Dadurch wird die enzymatische Natur der Reaktion festgestellt, und es muß in beiden Fällen D und G die gleiche Lösungsquote (16 Proz. bezw. 14 Proz.) dem H_2O_2 selbst zugeschrieben werden.

In den Proben E und H ist die Menge des Enzyms um die Hälfte vermindert; dadurch ist auch die Verminderung des aufgelösten Eiweißes geringer geworden. In B fanden wir eine Verminderung von 50 Proz., in D und G, durch die Wirkung von H_2O_2-Lösung (4 ccm von 2,5 Proz.) allein, eine Verminderung von 16 und 14 Proz. (durchschnittlich 15 Proz.); die Wirkung des Enzyms ist demnach 50 — 15 = 35 Proz.

In den Mischungen D und G mit nur 10 ccm roher, das heißt enzymhaltender Milch, bezeichnen 38 und 40 Proz. (durchschnittlich 39 Proz.) die Totalwirkung des H_2O_2 und des Enzyms; die Wirkung des Enzyms allein ist: 39 — 15 = 24 Proz. Weitere Untersuchungen werden ergeben, ob hier die Reaktionen der Menge des Enzyms proportional verlaufen.

V. Einfluß der sauren und alkalischen Reaktion auf die Auflösungsgeschwindigkeit.

Es wurde benutzt zentrifugierte Milch (C 115) von folgender chemischen Zusammensetzung. In 100 ccm:

Extrakt: 8,088 g, Asche: 0,644 g, Milchzucker: 4,124 g, Fett: 0,495 g, Kasein: 2,388 g, Albumin: 0,164 g.

Je 25 ccm dieser Milch wurden in sterilisierten Erlenmeyerschen Kolben mit 5 ccm reinem 2,5 proz. H_2O_2 versetzt und 8 Tage bei einer Temperatur von 35° C aufbewahrt:

A. ohne Zusatz,
B. mit einem Zusatz von 0,5 ccm 20 proz. Essigsäure (wodurch in der Milch ein Eiweißniederschlag entstand),
C. mit 0,05 ccm 20 proz. Essigsäure (kein Eiweißniederschlag),
D. mit 0,5 ccm normaler NaOH-Lösung,
E. mit 0,05 ccm normaler NaOH-Lösung,

Nach 8 tägiger Aufbewahrung bei 35° C, wurden die Mengen Kasein und Albumin nach Zusatz von 20 ccm Wasser auf die schon mitgeteilte Weise bestimmt:

Reaktion	g Kasein		g Albumin	
	in 25 ccm	in 100 ccm	in 25 ccm	in 100 ccm
A. amphoter	0,4771	1,9084	0,0290	0,1160
B. stark sauer	0,5678	2,2712	0,0227	0,0908
C. leicht sauer	0,4938	1,9782	0,0197	0,0788
D. stark alkalisch	0,4834	1,7336	0,0274	0,1096
E. leicht alkalisch	0,4567	1,8268	0,0132	0,0528

Daraus ergibt sich, daß für Kasein die Beschleunigung in alkalisierter Milch mit der NaOH-Konzentration, die Verzögerung bei saurer Reaktion mit der Essigsäurekonzentration zunimmt. Für Albumin wurden wechselnde Ergebnisse gefunden; doch wird seine Verdauung durch kleine Mengen Säure oder Alkali begünstigt.

VI.

Die Änderungen in der Zusammensetzung der Milch lassen sich auch auf biologischem Wege nachweisen, nämlich durch Präzipitation mit den entsprechenden Seris. Die präzipitierenden Sera wurden erhalten durch wiederholte intravenöse Injektionen beim Kaninchen 1. von abzentrifugierter Milch (Laktoserum), 2. einer 5proz. Lösung von Kasein (Merck) in Sodalösung (Kaseoserum). Es wurden je 2 Tropfen Milch auf 1 ccm natives bzw. verdünntes Serum zugesetzt. Das angegebene Resultat ist das nach 24 Stunden beobachtete.

Zunächst ergab sich, daß das Vorhandensein von Wasserstoffhyperoxyd keinen Einfluß auf die Reaktion hatte, daß auch die Verschiedenheit der Konzentrationen ohne Einfluß war.

Tabelle I.

Zentrifugierte Milch C 101; Gesamtkonzentration an $H_2O_2 = 0,3$ Proz.

	H_2O_2 noch vorhanden			Nach Katalyse		
Verdünnung des Serums mit physiol. NaCl-Lösung	1:1	1:5	1:10	1,1	1,5	1,10
Nach 2 Tagen						
Kan. Norm.-Serum	0	0	0	0	0	0
Kan. Lakto-Serum	+++	+	Sp.	+++	+	Sp.
Kan. Kaseo-Serum	+++	0	0	+++	0	0
Nach 40 Tagen						
Kan. Norm.-Serum	0	0	0	0	0	0
Kan. Lakto-Serum	+++	0	0	+++	0	0
Kan. Kaseo-Serum	+++	+	0	+++	+	0

Tabelle II.

Zentrifugierte Milch C 103.

	Frisch, ohne H_2O_2			Gesamtkonzentrat. des $H_2O_2 = 0,3$ Proz.; nach 2 Tagen			Gesamtkonzentrat. des $H_2O_2 = 0,6$ Proz.; nach 2 Tagen		
Verdünnung des Serums mit physiol. NaCl-Lösung	1:1	1:5	1:10	1:1	1:5	1:10	1:1	1:5	1:10
Kan. Norm.-Serum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kan. Lakto-Serum	+++	0	0	+++	++	Sp.	+++	++	Sp.
Kan. Kaseo-Serum	+	0	0	+++	0	0	+++	0	0

Schon aus dieser Tabelle läßt sich entnehmen, daß die Autodigestion der Milch eine Änderung in der Menge der verschiedenen präzipitablen Substanzen hervorruft.

Wiederholte Prüfungen mit verschiedenen Seris und Milchproben ergaben in dieser Beziehung konstante Resultate:

Tabelle III.

Zentrifugierte Milch C 101 und C 103; Gesamtkonzentration an H_2O_2 = 0,3 Proz.

	C 101; nach 1 Tag			C 103; nach 10 Tagen		
Verdünnung des Serums mit physiol. NaCl-Lösung	1:1	1:5	1:10	1:1	1:5	1:10
Kan. Norm.-Serum	0	0	0	0	0	0
Kan. Lakto-Serum	+++	++	+	+++	++	+
Kan. Kaseo-Serum	++	0	0	++	Sp.	0

Cf. Tabelle 1.

Die Änderung ist viel stärker ausgesprochen, wenn die Autodigestion durch Verbleiben im Brutofen begünstigt wird:

Tabelle IV.

Zentrifugierte Milch.

	Milch C 114 ohne H_2O_2 frisch			Milch C 109 im ganzen 2 Monate bei Laboratoriumtemp. aufbewahrt; Gesamtkonzentr. des H_2O_2 = 0,3 %, am 12. Tage katalysiert			Milch C 109 im ganzen 2 Mon. aufb. 1 Monat bei Lab.-Temp. und 1 Monat im Brutofen bei 37°; Gesamtkonzentr. des H_2O_2 = 0,3 %, am 12. Tage katalysiert		
Verdünnung des Serums mit physiol. NaCl-Lösung	1:1	1:5	1:10	1:1	1:5	1:10	1:1	1:5	1:10
Kan. Norm.-Serum	0	0	0	0	0	0	+	Sp.	0
Kan. Lakto-Serum	+++	+	0	+++	+++	++	+++	++	++
Kan. Kaseo-Serum	0	0	0	+	0	0	++	+	+

Aus diesen Tabellen läßt sich nun entnehmen, daß durch Autodigestion der Milch die präzipitable Substanz zunimmt, das heißt, daß sich die Eiweißstoffe in Verbindungen umwandeln, welche sich leichter durch entsprechende Sera päzipitieren lassen. Diese Zunahme läßt sich daraus erschließen, daß bei der umgewandelten Milch noch bedeutend größere Verdünnungen des Serums Fällung bewirken als bei frischer Milch.

Diese Zunahme betrifft in erster Reihe die durch Laktoserum fällbare Quote, viel langsamer und in geringerem Maass tritt sie bei dem durch Kaseoserum fällbaren Anteil ein.

Bei der Fällung durch Laktoserum kann man bemerken — gerade weil diese die ausgiebigere ist — daß sie bei frischer

Milch in einem kompakten Klumpen geschieht, dagegen bei der veränderten Milch in feinen Flocken.

Eine genauere Deutung dieser Ergebnisse dürfte sich später im Lichte der neuesten Forschungen über die Agglutinations- und die Präzipitationserscheinungen ausarbeiten lassen.

VII.

Zum Schluß haben wir die Fällung durch Labferment in mit Wasserstoffhyperoxyd aufbewahrten Milcharten untersucht. Einer*) von uns hatte gefunden, daß der Zusatz von H_2O_2 auf dieses Ferment eine beschleunigende Wirkung ausübt. Das Ergebnis ist dagegen ein anderes, wenn die Fermentlösung der mit Wasserstoffhyperoxyd aufbewahrten Milch zugefügt wird. Das läßt sich leicht aus der Selbstverdauung des Kaseins und demnach aus der Verminderung der fällbaren Eiweißmengen, erklären.

Die Geschwindigkeit der Fällung wurde für die frische mit Wasserstoffhyperoxyd versetzte Milch und für die normale Milch gleich befunden.

Bei diesen Untersuchungen wurde das schon früher**) benutzte Labpräparat verwendet.

Je 10 ccm der untersuchten Milcharten wurden in Probierröhrchen mit 1 und 2 ccm des frischen Labpräparates und mit 0,2 und 0,5 ccm der glycerinhaltenden Fermentlösung versetzt, geschüttelt und endlich sich selbst überlassen.

Benutzt wurden:

A. Frische Vollmilch,
B. Frische Vollmilch mit H_2O_2 (12 ccm 2,5 proz. H_2O_2 + 100 ccm Milch) sofort,
C. Vollmilch mit H_2O_2 (Konz. wie B) nach 5 Stunden,
D. Vollmilch mit H_2O_2 (Konz. wie B) nach 24 Stunden,
E. Vollmilch mit H_2O_2 (Konz. wie B) nach 2 Tagen,
F. Vollmilch mit H_2O_2 (Konz. wie B) nach 3 Tagen,
G. Vollmilch mit H_2O_2 (Konz. wie B) nach 4 Tagen,
H. Vollmilch mit H_2O_2 (Konz. wie B) nach 78 Tagen,
I. Zentrifugierte Milch C 109, mit Blutkatalase von H_2O_2 befreit, mit 1,66 Proz. Kasein und 0,22 Proz. Albumin.

Versuchstemperatur = etwa 18° C.

(Siehe Tabelle auf nebenstehender Seite.)

Das präzipitierte Kasein schied sich in frischen Milchproben mehr körnig, in den Milchproben, welche längere Zeiten unter dem Einfluß des H_2O_2 und des proteolytischen Ferments gestanden hatten, mehr gallertig aus.

---

*) A. J. J. Vandevelde, loc. cit.
**) A. J. J. Vandevelde, loc. cit.

Milch	Beginn der Koagulation nach			
	10 ccm Milch + 1 ccm Lab.	10 ccm Milch + 2 ccm Lab.	10 ccm Milch + 0,2 ccm glyc. Lab.	10 ccm Milch + 0,5 ccm glyc. Lab.
A	15 Min.	15 Min.	1 St. 50 Min.	1 St. 45 Min.
B	15 Min.	15 Min.	1 St. 10 Min.	50 Min.
C	15 Min.	15 Min.	55 Min.	50 Min.
D	15 Min.	15 Min.	3 St.	2 St. 55 Min.
E	19 Min.	17 Min.	3 St.	2 St. 55 Min.
F	—	—	3 St. 10 Min.	3 St.
G	—	—	3 St.	2 St. 50 Min.
H	25 Min.	25 Min.	3 St. 10 Min.	3 St. 10 Min.
I	1 St. 45 Min.	1 St. 45 Min.	3 St. 10 Min.	3 St. 10 Min.

VIII.

Schlußfolgerungen.

Durch Anwendung von Wasserstoffhyperoxyd wird eine Sterilisierung der Milch erzielt, welche die Enzyme nicht angreift; dadurch lässt sich die Gegenwart eines proteolytischen Enzyms nachweisen unter Bedingungen, welche eine genaue Untersuchung ermöglichen.

Die Wirkung dieses Enzyms wird durch alkalische Reaktion erhöht.

Dem Wasserstoffhyperoxyd muß zwar eine eigene eiweißlösende Wirkung zuerkannt werden, doch läßt sich diese leicht von der enzymatischen Wirkung trennen. Die eingetretenen Änderungen in der Zusammensetzung der Milch lassen sich auch auf biologischem Wege nachweisen, nämlich durch Präzipitation mit den zugehörigen Seris, und auch durch Labfermentfällung.

Gent, Juli 1904.

Kürzere Mitteilungen.

9. Über das Vorkommen von Taurin in den Muskeln von Weichtieren.

Von **Lafayette B. Mendel.**

Aus dem Sheffield-Laboratorium für physiologische Chemie, Yale Universität. New Haven U. S. A.

Die jüngst erschienene interessante Mitteilung von A. Kelly*) über das Vorkommen von Taurin und Glykokoll bei Pecten opercularis und Mytilus edulis veranlaßt mich über ähnliche vor einiger Zeit im hiesigen Laboratorium gemachte Befunde zu berichten. Bei Gelegenheit einer chemischen Untersuchung verschiedener See-Gastropoden, die Herr H. C. Bradley unter meiner Leitung ausführte, gelang es ihm erhebliche Taurinmengen aus dem Wasserauszug der großen Muskeln von Sycotypus canaliculatus und Fulgur carica zu gewinnen. Die Anwesenheit einer bemerkenswerten Menge von Zink in dem Hepatopankreas von bei New Haven zu verschiedenen Zeiten gefangenen Individuen dieser Spezies ist bereits anderweitig mitgeteilt worden**). Das Taurin kristallisierte aus dem Muskelextrakt nach Entfernung des Eiweißes durch Koagulation und des Glykokolls durch Alkohol aus. Nach dem Umkristallisieren ergab die Analyse:

	Gefunden:	Berechnet für $C_2H_7NSO_3$:
N =	11,37 Proz.	11,21 Proz.
S =	25,9 „	25,6 „

Unter Mitwirkung von Herrn M. E. Jaffa habe ich durch ein ähnliches Vorgehen Taurin aus dem kräftigen Muskel von Haliotis, der „Abalone“ der Pacific-Küste, rein dargestellt. (Gefunden N = 11,18 Proz., S = 25,8 Proz.) Daneben waren etwas Hypoxanthin und viel Glykogen vorhanden. Die Anwesenheit einer erheblichen Menge organischen Schwefels in dem Muskelextrakt von Pecten irradians, worin Chittenden zuerst Glykokoll nachgewiesen hat, macht es wahrscheinlich, daß Taurin auch bei dieser Spezies vorkommt. Doch ist es uns noch nicht gelungen, es in befriedigender Weise zu isolieren.

*) Diese Beiträge 5, 380 (1904).

**) Science, 29. Januar, 19, 196 (1904).

10. Nachtrag zu meiner Abhandlung „Über ein proteolytisches Ferment im Blute bei myelogener Leukämie.“

Von **O. Schumm.**

Aus dem chemischen Laboratorium des Allgemeinen Krankenhauses Hamburg-Eppendorf.

In einer kürzlich erschienenen Mitteilung*) weist F. Erben darauf hin, daß er schon vor mir bei Leukämie im Blute ein proteolytisches Ferment nachgewiesen habe. Die betreffende Arbeit ist mir seinerzeit leider entgangen und ich erkenne gern die Priorität Erbens in bezug auf den Nachweis eines proteolytischen Fermentes an.

Da ich noch nicht wieder Gelegenheit gehabt habe, geeignetes Material in genügender Menge zu erhalten, um über die Wirkungsweise des Fermentes weitere Versuche auszuführen, so habe ich den von meiner damaligen Untersuchung stammenden Rest der Verdauungsflüssigkeit, der 70 g Blut entsprach, nach den Methoden von Kossel und Kutscher auf Eiweißbasen untersucht. Es gelang mir, Lysin in Gestalt reinen Picrats zu isolieren. Die Ausbeute betrug 0,17 g.

Analyse:

0,1649 g gaben 0,2356 g CO_2 und 0,0733 g H_2O.
= 38,97 Proz. C und 4,94 Proz. H.
Berechnet: 38,40 Proz. C und 4,53 Proz. H.

Ob Histidin und Arginin ebenfalls vorhanden waren, muß ich unentschieden lassen; ich erhielt in den betreffenden Fraktionen nur winzige Mengen amorpher Substanz, deren Identifizierung nicht möglich war.

Die von mir bisher im leukämischen Blute nachgewiesenen Produkte fermentativer Eiweißspaltung sind folgende: Primäre und sekundäre Albumosen, Pepton (Kühne), Leucin, Tyrosin, Lysin, Ammoniak, Tryptophan.

Seegen-Preis.

Die mathem.-naturw. Klasse der kaiserlichen Akademie hat in ihrer Sitzung vom 13. Mai l. J. beschlossen, den Einreichungstermin für den von weiland k. M. Professor J. Seegen gestifteten Preis bis zum 1. Februar 1906 zu verlängern. Der Wortlaut dieser Ausschreibung ist:

> „Es ist festzustellen, ob ein Bruchteil des Stickstoffes der im tierischen Körper umgesetzten Albuminate als freier Stickstoff in Gasform, sei es durch die Lunge, sei es durch die Haut ausgeschieden wird.
>
> Der Preis beträgt 6000 Kronen. Die konkurrierenden Arbeiten sind, in deutscher, französischer oder englischer Sprache abgefaßt, vor dem 1. Februar 1906 an die Kanzlei der kaiserl. Akademie der Wissenschaften einzusenden. Die Verkündigung der Preiszuerkennung findet in der feierlichen Sitzung der Akademie Ende Mai 1906 statt.“

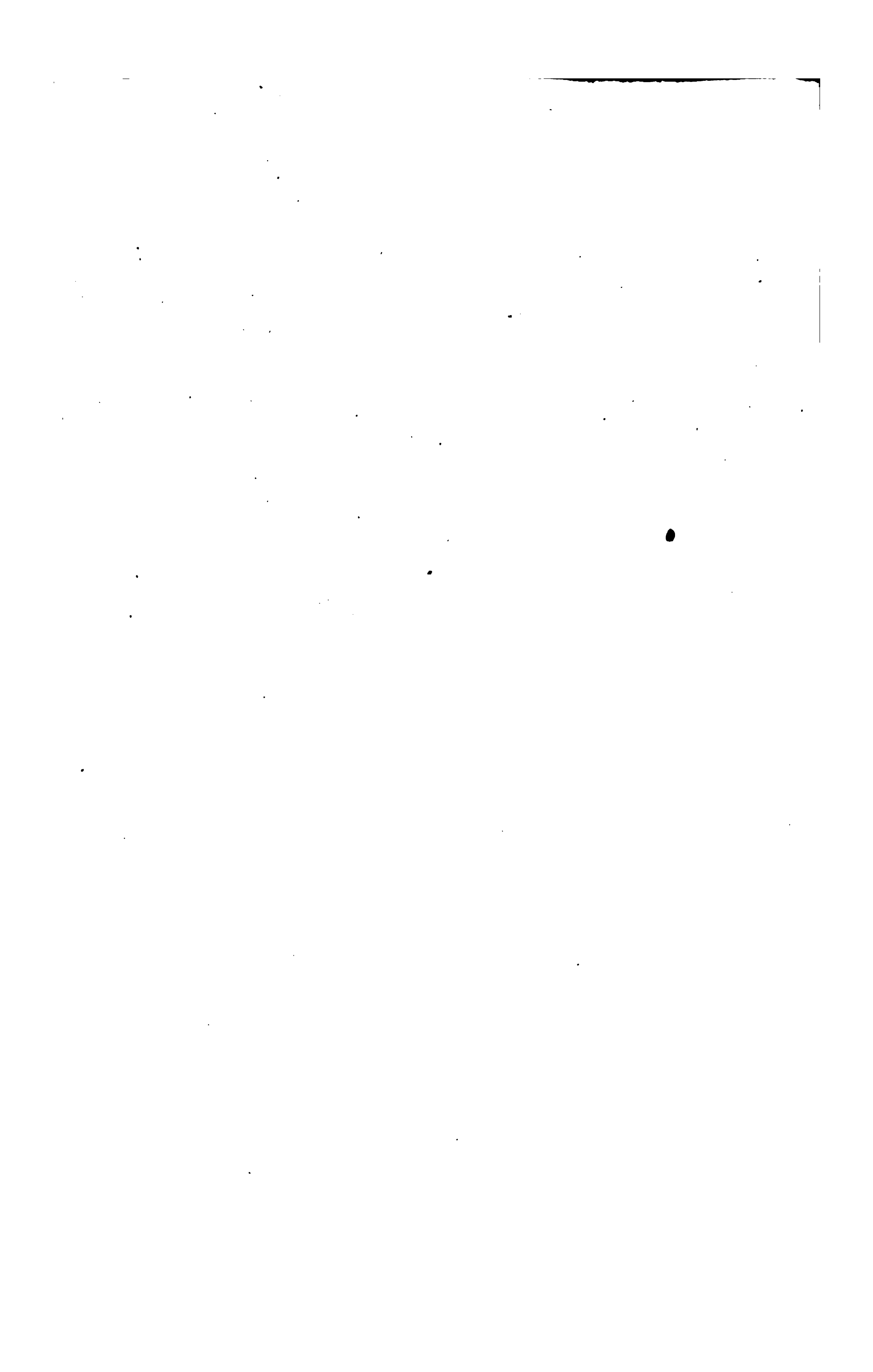
Berichtigung.

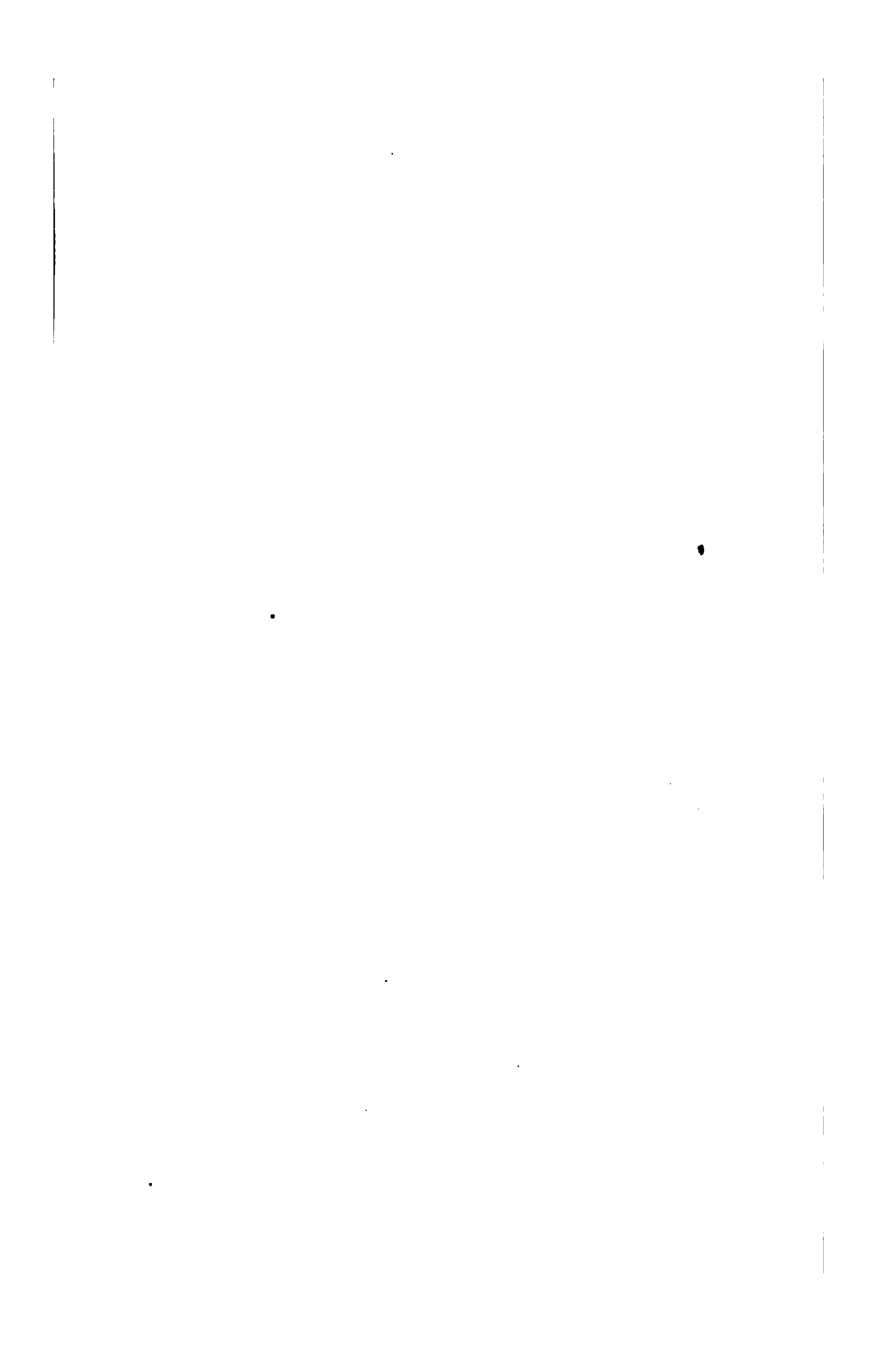
In dem Aufsatze „Über die Bestimmung des Glycerins im Harn“, diese Beiträge 5, soll es S. 427, Zeile 12 v. unten und S. 428, Zeile 15 von oben statt Natriumarseniat richtig Natriumarsenit heißen.

*) Diese Beiträge, 5, 461.

Verzeichnis der Mitarbeiter des 5. Bandes.

A. W. ZICKFELDT, OSTERWIECK/HARZ.







DATE DUE SLIP
UNIVERSITY OF CALIFORNIA MEDICAL SCHOOL LIBRARY
THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE STAMPED BELOW
FEB 24 1930
7 DAY
FEB 26 1969
RETURNED 3/5/69
BY MAIL
RETURNED
MAR 5 1969
½m-11,'22


v.5 Beiträge zur chemischen
1904 Physiologie und Pathologie.
11426
Mr. Lang
FEB 24 1930
FEB 15 1930
11426
University of Ca
pitals

